UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 838

LE SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE SÉRIQUE ET URINAIRE DANS LES MALADIES CANCÉREUSES

Son rôle dans le diagnostic et l'immunologie

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 1964
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

GÉRARD MAYER
Pharmacien
Diplômé d'Études Spéciales de Sérologie
Diplômé de Bactériologie Technique

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MALGRAS, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1964

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 No 838

LE SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE SÉRIQUE ET URINAIRE DANS LES MALADIES CANCÉREUSES

Son rôle dans le diagnostic et l'immunologie

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 1964
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

GÉRARD MAYER
Pharmacien
Diplômé d'Études Spéciales de Sérologie
Diplômé de Bactériologie Technique

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MALGRAS, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1964

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. GAZET DU CHATELIER, *Doyen*, I. ✪
P. DUQUÉNOIS, *Doyen honoraire*, ❋, I. ✪, ⚜
J. SCHREIBER, *Assesseur*, I. ✪

PROFESSEURS :

MM.	R. SARTORY, O. ❋ I. ✪, O. ⚜	Bactériologie
	P. CORDIER, ❋, I. ✪	Pharmacie chimique
	P. DUQUÉNOIS, ❋, I. ✪, ⚜	Matière médicale
	P. JAEGER, I. ✪, ⚜	Botanique
	G. GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	M. HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	J. SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	P. MÉTAIS	Chimie biologique
	G. LAUSTRIAT	Physique
	A. LEDOUX, ⚜, ✪	Zoologie

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ch. LAPP, ❋ I. ✪, J.P. EBEL, ❋ ⚜ I. ✪

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	J. MALGRAS	Sciences naturelles
	Ch. F. LAPP	Sciences physico-chimiques
	G. DIRHEIMER	Sciences appliquées
	L. JUNG	Physique

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. E. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	R. SARTORY	Cryptogamie-Bactériologie pharmaceutique, technique bactériologique
	P. DUQUÉNOIS	Hydrologie
	G. GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	J. SCHREIBER	Compléments de Chimie organique
	P. MÉTAIS	Biochimie pharmaceutique et technique
	G. LAUSTRIAT	Éléments de Mathématiques, Acoustique, Physique biologique appliquée
	N.	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	J. MALGRAS	Sérologie
	G. DIRHEIMER	C.E. Supérieures de Chimie biologique
	G. GREINER	Pathologie de l'oreille et phonétique
	C. MEYER	Comptabilité et Fiscalité pharmaceutiques
	C. MATHIS	Pharmacie galénique (N. R.)

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mmes	M. KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
	N. OURISSON	Histoire naturelle
MM.	C. MATHIS	Chimie
	A. STAHL	Bactériologie et Parasitologie
	Ch. ROMOND (délégué dans les fonctions)	Bactériologie
	C. WERMUTH (délégué dans les fonctions)	Chimie
Mlles	D. SCHAELDERLÉ (délégée dans les fonctions)	Physique et Chimie
	C. ASSENMACHER (déléguée dans les fonct.)	Chimie
Mme	E. TERRAIL (déléguée dans les fonctions)	Chimie biologique
M.	P. LAUGEL (délégué dans les fonctions)	Physique

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur René SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Paul CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur Jacques MALGRAS

Maître de Conférences de Sciences Naturelles
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes Parents,

je dédie ce travail en témoignage d'affection filiale
et en reconnaissance de tout ce que je leur dois.

A Tous ceux que j'aime.

INTRODUCTION

Les données expérimentales sur *l'activité enzymatique dans les tissus cancéreux* ont énormément augmenté dans les trois dernières décennies. Aussi reconnaît-on une grande importance aux recherches démontrant une modification de ces propriétés enzymatiques, comme le fait si justement remarquer GREENSTEIN (1).

A la suite de ces constatations, on peut soulever deux questions : Quelles sont les relations entre la *genèse du cancer* et la *modification du métabolisme enzymatique* d'une cellule ? Quel est le rapport entre le *développement d'un cancer*, l'*activité enzymatique* et le *métabolisme cellulaire ?*

En ce qui concerne la première de ces questions, KARLSON (2) estime que nous n'avons pas de preuves expérimentales directes de la dépendance génétique directe en qualité et en quantité, des enzymes dans la cellule des mammifères ; cependant, par analogie avec ce que l'on connaît chez les êtres inférieurs, on peut admettre que cette dépendance existe aussi chez les êtres supérieurs. Ce problème touche ainsi la théorie de mutation dans la genèse du cancer, puisque celle-ci doit se faire par l'interaction des propriétés génétiques et des ferments que chaque cellule élabore sur une base héréditaire. Il est notoire que la teneur en enzymes des cellules vivantes est beaucoup plus grande que celle nécessaire, à dose minimale, pour l'accomplissement du métabolisme normal. Ce fait est valable seulement si les enzymes peuvent travailler avec une activité optimale dans l'organisme vivant. D'autre part, on sait que la plupart des produits importants pour la cellule vivante n'existent qu'à des concentrations très faibles, le plus souvent de l'ordre molaire de 10^{-4}. De ce fait on peut conclure que le facteur réactionnel important ne réside pas dans la concentration ou dans l'activité des enzymes, mais dans la concentration des substrats spécifiques, ce qui peut être illustré par deux exemples :

L'activité enzymatique contrôlée habituellement au moyen d'homogénat tissulaire doit être déterminée dans des conditions d'activité maximales. LANG (3) a démontré que les *enzymes de la glycolyse et du cytochrome C* existent dans les muscles à des doses dépassant 500 à 600 fois le taux nécesssaire à la dégradation enzymatique. La concentration de substrat employée dans ces essais est en général 100 fois plus forte, au moins, que celle existant normalement dans la cellule vivante. *On peut donc conclure que les dosages de l'activité enzymatique optimale ne permettent pas de déduction quant au potentiel du métabolisme en expérience.*

Il faut cependant se rappeler que dans la plupart des cas, un certain nombre d'enzymes interviennent dans le métabolisme tissulaire. Un exemple typique est constitué par l'acide pyruvique, pour lequel l'*hydratation* en acide lactique, la *transamination* en alanine, la *carboxylation* en acide malique respectivement en acide oxalacétique, et finalement la *décarboxylation* en acide acétique, sont autant de *réactions métaboliques* bien connues. On voit ainsi que pour étudier le métabolisme de l'acide pyruvique, il ne faut pas prendre en considération uniquement la valeur potentielle des enzymes, mais surtout les différentes voies de la dégradation. Si au cours du processus métabolique, des modifications interviennent, comme par exemple une augmentation de l'activité des transaminases, elles changeront de catabolisme malgré la valeur optimale d'un des enzymes examinés; ainsi, dans le cas cité, on assistera à une augmentation de la genèse de l'alanine au détriment de l'acide oxalacétique et de l'acide acétique.

On voit donc que le dosage des enzymes dans les tissus requiert une importance plus grande que le contrôle de l'activité optimale des différents enzymes intervenant dans un processus métabolique donné. *A priori*, il n'existe donc pas de relation directe entre l'activité enzymatique et l'évolution du processus métabolique, d'où les grandes divergences dans les résultats donnés par la littérature spécialisée à ce sujet. Ceci n'est pas étonnant, puisqu'il faut se rappeler que tous les ferments possèdent un composant protéique et dépendent par conséquent de toutes les lois du métabolisme protéique cellulaire. De ce fait, des modifications de ce métabolisme dans les cellules doivent forcément se répercuter sur l'activité enzymatique. Il existe dans la littérature de nombreux exemples ayant trait à ce sujet, mais il nous semble intéressant d'examiner les données expérimentales sur *l'activité enzymatique dans les tissus cancéreux* pour éventuellement contrôler le rapport entre les modifications du métabolisme protéique et les processus enzymatiques, expériences qui font l'objet de notre travail, au cours duquel nous aurons l'occasion d'étudier plus particulièrement le *métabolisme de la Fibrinolysine.*

D'après Abderhalden, il faut admettre que les substances sécrétées ou excrétées, susceptibles de passer dans le sang ou dans les urines au cours du métabolisme général de l'organisme, possèdent une constitution rigoureusement spécifique et que, d'autre part, les métabolites de cet organisme qui réagissent sous l'influence de substances hétérogènes, se différencient nettement des métabolites normaux. On voit qu'à part les substances idiogènes de chaque organisme, il en est d'autres : substances étrangères ou hétérogènes contre lesquelles tout individu vivant doit se défendre, étant donné que la constitution physico-chimique de ces produits ne possède pas les caractères spécifiques individuels de l'espèce. On comprend ainsi que dans les cas de cancer, où l'on voit apparaître soit des cellules physiologiquement anarchiques, soit des enzymes et d'autres produits cellulaires hétérogènes, il doit se former des substances de défense que l'on peut considérer comme des anticorps ou des antiferments dans le sens d'Abderhalden.

Le problème du métabolisme de la *Fibrinolysine* entre dans le cadre de ces considérations, puisqu'il est actuellement notoire que l'organisme normal élabore des *Antifibrinolysines* et qu'il y a donc un *équilibre physiologique entre le ferment et son anticorps.*

Nous voyons ainsi que l'étude du métabolisme de la *Fibrinolysine* touche à la fois à l'immunologie et à l'enzymologie. Ce ferment a un intérêt tout particulier, puisqu'il a été trouvé à un taux anormalement élevé par NITSCHE (4) puis par ARON (5) dans les urines de cancéreux et le premier auteur l'a proposé comme critère de diagnostic précoce du cancer.

Notre ambition est d'ajouter un maillon à la chaîne des recherches effectuées à ce sujet dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* par GREGO (6) et SALADIN (7).

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous ne voudrions pas manquer de remercier chaleureusement Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour l'accueil si aimable qu'il nous a réservé dans son Laboratoire et pour le grand honneur qu'il nous fait aujourd'hui en présidant le jury de notre thèse.

Que Monsieur P. CORDIER, *Professeur de Pharmacie Chimique* et Monsieur J. MALGRAS, *Maître de Conférences de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, trouvent ici l'expression de notre gratitude pour avoir bien voulu accepter de siéger dans ce jury.

Nous devons une reconnaissance toute particulière à Monsieur J. MEYER, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*. Après nous avoir suggéré le sujet de notre travail, il nous a soutenu et encouragé de ses conseils, nous aidant dans la mesure du possible à atteindre le but que nous nous étions fixé.

Nous voudrions remercier aussi Monsieur le Professeur CHEVALLIER, du *Centre Anticancéreux Paul-Strauss à Strasbourg*, qui nous a procuré le matériel pathologique indispensable à nos travaux, ainsi que Monsieur G. HIRTZ, *Docteur en Pharmacie*, qui a mis son Thrombographe à notre disposition.

PLAN DE TRAVAIL

Le but de notre travail est l'*étude du pouvoir fibrinolytique des urines de cancéreux* par un Thrombographe mis au point par HIRTZ; d'autre part, nous étudions les éventuelles *propriétés antigéniques* de cet élément lytique, mis en évidence de cette manière.

La *partie historique* de notre travail a trait à divers aspects de la fibrinolyse. Dans un *premier chapitre*, nous exposons quelques données chronologiques.

Dans le *Chapitre II*, nous résumons différentes hypothèses émises quant à la nature de cette réaction et de son inhibition par l'Antifibrinolysine.

Le *Chapitre III* contient les principales données expérimentales que nous avons trouvées dans la littérature scientifique, en ce qui concerne les diverses méthodes d'extraction, les propriétés physico-chimiques et les mesures des propriétés lytiques.

Dans le *dernier chapitre* de la partie historique, nous mettons en rapport fibrinolyse et cancer.

La *deuxième partie* de notre exposé est consacrée à nos travaux personnels. Dans le *Chapitre V*, nous rapportons la méthode d'appréciation du phénomène lytique par le Thrombographe de HIRTZ.

Dans le *Chapitre VI*, nous étudions les influences diverses des sérums sains et pathologiques sur la fibrinolyse.

Dans un *dernier Chapitre* nous décrivons nos travaux sur les essais biologiques de production d'anticorps antifibrinolytiques.

Des *Conclusions générales* terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LA FIBRINOLYSE

Faisons d'abord l'historique de la terminologie utilisée par les différents auteurs. CHRISTENSEN et Mac LEOD (8) distinguent le *Plasminogène*, qui est l'enzyme protéolytique inactif du plasma, la *Streptokinase* qui est le facteur activant sécrété par les Streptocoques, et la *Plasmine*, qui est le Plasminogène activé par la Streptokinase.

FERGUSON (9) désigne ces trois facteurs par les termes de : *Tryptogène*, *Tryptokinase et Tryptase*. LOOMIS, GEORGE et RYDER (10) proposent le terme de *Profibrinolysine*, *Streptokinase et Fibrinolysine*. Les termes *Plasminogène*, *Tryptogène et Profibrinolysine* s'appliquent ainsi au précurseur plasmatique de la protéase. Les termes *Plasmine*, *Tryptase et Fibrinolysine* désignent la protéase plasmatique activée. Les termes *Streptokinase*, *Tryptokinase* se confondent avec l'ancienne *Fibrinolysine streptococcique*.

ASTRUP et PERMIN (11) ont proposé en outre d'appeler *Fibrinokinase* le facteur qu'ils ont isolé à partir des tissus animaux et qui se comporte comme la Streptokinase, c'est-à-dire qu'il transforme la *Profibrinolysine* inactive en *Fibrinolysine* active.

Il existe une analogie très poussée entre l'activation du Plasminogène par la Streptokinase et l'activation du Trypsinogène pancréatique par l'Entérokinase. Le *Plasminogène* serait le pendant du *Trypsinogène*, la *Plasmine* celui de la *Trypsine*, la *Streptokinase* celui de l'*Entérokinase*. Il ne semble pas, toutefois, que la protéase plasmatique corresponde à la Trypsine, bien que les deux Antitrypsines actuellement isolées et cristallisées, l'Antitrypsine pancréatique et l'Antitrypsine de soja, inhibent toutes les deux son action, d'après FERGUSON, PRAVIS et GERHEIM (12). En effet, le *Trypsinogène* et le *Plasminogène* ont chacun leur activateur spécifique, l'*Entérokinase* dans un cas, la *Streptokinase* dans l'autre. L'Entérokinase n'active pas le Plasminogène et la Streptokinase n'active pas le Trypsinogène. D'autre part, d'après TAGNON (13), la protéase plasmatique existe chez les animaux dépancréatisés.

La protéase plasmatique appartient à la fraction des globulines; il existe en même temps dans le plasma un inhibiteur, qui est lié aux albumines. Cet inhibiteur a été désigné par les termes : *Antitryptase*, *Antiplasmine* et *Antifibrinolysine;* il détruit la *Fibrinolysine*, mais pas la *Profibrinolysine*. Le plasma peut encore contenir un facteur qui neutralise l'exotoxine streptococcique, c'est l'*Antistreptokinase* ou l'*Antitryptokinase* ou l'*Antifibrinolysine streptococcique*. Il s'agit là d'un anticorps dans le sang des sujets atteints d'une affection streptococcique.

En ce qui concerne le processus de fibrinolyse, il s'agit d'un phénomène réactionnel qui aboutit à la dissolution d'un caillot de fibrine. Ce fait à été observé depuis longtemps sans que l'on ait pu expliquer son origine et son mécanisme.

Décrite pour la première fois par Denis en 1838, la *fibrinolyse* fut identifiée comme étant une protéolyse par Plosz, puis par Arthus (*Précis de Chimie physiologique*, *Masson*, *Paris*, *8e édition*, 1920).

En effet, si l'on conserve le caillot aseptiquement dans son propre sérum, il demeure intact pendant quelques jours. Toutefois, dans certains cas, on constate une dissolution qui peut être totale ou partielle. Il s'agit du phénomène appelé par Dastre (14) « *fibrinolyse* ». Celle-ci n'est pas une dissolution simple : on se trouve en effet en présence d'un processus irréversible et l'adjonction de la Thrombine à la Fibrine lysée ne s'accompagne pas d'une nouvelle coagulation. La dissolution aseptique du caillot résulte de la digestion de la Fibrine par une protéase sérique.

Le chirurgien russe Judin (15) a étudié la *coagulation du sang de cadavres* dans le but de l'utiliser pour des transfusions. D'après cet auteur, le sang de personnes saines, mortes subitement, prélevé dans les premières heures après le décès, coagule rapidement et donne naissance à un caillot qui se liquéfie aseptiquement et disparaît au bout de 30 à 60 minutes. La fibrinolyse se voit donc dans le cas de mort subite : elle explique pourquoi dans certains cas, le sang des cadavres reste fluide. On pensa pouvoir attribuer ce phénomène à des éléments cellulaires sécrétant un ferment protéolytique. Cette question a été étudiée en 1908 par Nolf (16) qui a montré que le phénomène est intimement lié à la coagulation même et indépendant de tout élément cellulaire. Pour lui, la fibrinolyse succède à la coagulation lorsque tous les facteurs antiprotéolytiques normalement présents dans le sang sont éliminés.

La première fibrinolyse « in vivo » a été réalisée en injectant de la peptone à des chiens ayant subi au préalable l'ablation du foie. Depuis lors, les méthodes pour obtenir la fibrinolyse ou pour isoler le ferment responsable se sont succédées. Opie et Barker (17) l'ont déjà obtenue en 1907 par précipitation acide du sérum. Une première contribution à l'éclaircissement de ce problème a été apportée antérieurement, en 1903, par Delezenne et Pozerski (18) qui ont constaté que l'addition de *chloroforme* au sérum augmentait les propriétés fibrinolytiques de celui-ci.

Les constatations de Judin pour l'homme ont ensuite été observées chez des animaux morts à la suite d'asphyxie, mais dont le cœur con-

tinue encore à battre. Dans ce cas, le sang reste fluide dans le système vasculaire, mais est dépourvu de Fibrinogène. L'activité fibrinolytique de ce sang de cadavre augmente dans les premières heures après la mort, et disparaît progressivement après un ou deux jours, comme Berg (19) l'a montré. *Dans tous ces cas, il s'agit d'une véritable fibrinolyse, et non pas d'une fibrinogénolyse.* La fibrinolyse est toujours très manifeste dans le cas de mort par asphyxie ou par hémorragie. Ainsi, on l'observe également dans les embolies par air, graisse ou thrombose, dans les œdèmes pulmonaires, dans les intoxications par CO, KCN, par l'alcool méthylique et éthylique et par urémie. Il semble que l'anoxhémie et l'hypersécrétion d'adrénaline jouent un rôle important, comme le fait remarquer Mullertz (20).

La fibrinolyse fait défaut, par contre, chez les sujets morts de maladies consomptives, de tumeurs malignes et d'infections chroniques.

La Fibrinolysine du sang de cadavre dégrade le Fibrinogène et la Fibrine de la même manière que la Streptokinase activée. Les auteurs ne sont pas encore d'accord sur le fait qu'il s'agit là d'une fibrinolyse ou d'une fibrinogénolyse. Il en est de même en ce qui concerne le sang menstruel ainsi que le sang fluidifié dans les cavités séreuses.

La fibrinolyse spontanée est en général rare; d'après Kerrinnes-Jauernig et Knobloch (21) elle est indépendante de l'âge du sujet. Ainsi on la rencontre plus fréquemment après intervention chirurgicale et anesthésie, quels que soient l'âge du sujet, la gravité de l'opération et la méthode d'anesthésie. Von Kaulla (22) décrit des cas de fibrinolyse déclenchés par des injections sous-cutanées de grandes quantités de liquides. Des traumatismes psychiques, énervement ou peur, peuvent aussi bien déclencher une fibrinolyse spontanée que les traumatismes physiques, de même que l'irradiation par les rayons ultra-violets ou les rayons X. Deutsch (23) a observé des fibrinolyses spontanées chez des sujets atteints de schizophrénie aiguë, alors qu'elle faisait défaut dans les cas de convalescence. Cet auteur n'a pas pu l'observer dans le cas d'électrochoc et de choc d'insuline. Berg et Fantl (24) l'ont observée régulièrement dans la première minute de l'électrochoc. Soulier (25) l'a constatée dans les chocs par l'acétylcholine. D'autre part, on cite des cas de fibrinolyse spontanée dans les insuffisances cardiaques, les hépatites, les cirrhoses après hépatectomie, dans les infarctus du myocarde, les leucémies lymphatiques aiguës et chroniques, chez les convalescents de pneumonie, dans les toxicoses gravidiques et au cours de l'accouchement. Finalement, nous insistons sur les fibrinolyses spontanées dans les carcinomes de prostate et leurs métastases, qui nous intéressent particulièrement.

On peut augmenter « in vitro » la fibrinolyse spontanée par addition de Thrombokinase, de Lécithine, de Toluène, de Xylol et d'Alcool octylique, comme Halse (26) et Berg (27) l'ont constaté.

Les fibrinolyses médicamenteuses peuvent apparaître à la suite de traitements agissant sur le système nerveux autonome. On a cité à ce sujet l'injection d'Adrénaline, de Priscol, de Tyroxine, de Nicotine et

même de petites doses de Vitamine K. Par contre, les parasympathicomimétiques, tels que l'Acétylcholine et la Prostigmine, freinent la fibrinolyse. On note également une action stimulante de la fibrinolyse par l'ACTH, les cortisones, les hormones thyréotropes, puis par l'Acide paraaminobenzoïque, la Novocaïne, l'Adrénochrome, des substances hydrotropes, telles que l'Urée à des concentrations dépassant 15%, l'hypurate, le benzoate, le salicylate de sodium, qui agissent principalement sur le fibrinogène.

La fibrinolyse est entravée par le kaolin, le sulfate de baryum, le carbonate de calcium, le glutathion, la cystéine, le bleu de méthylène, l'hydroquinone et par l'urée en faible concentration.

Les médicaments antihistaminiques sont inactifs sur la fibrinolyse aux doses thérapeutiques, mais la freinent à forte concentration.

L'influence de l'héparine et des héparinoïdes n'est pas encore complètement éclaircie; Deutsch pense que ces substances anticoagulantes diminuent la consistance du coagulum qui est ainsi plus facilement attaqué par la Fibrinolysine, sans que l'activité de cette dernière soit modifiée.

En ce qui concerne l'origine et l'intérêt clinique de la Fibrinolysine, nous avons trouvé les données suivantes :

L'enzyme fibrinolytique peut être isolé du plasma ou du sérum dans la fraction III/3 de Cohn. D'après Christensen, les plasmas de bœuf, de cheval, de chien, de singe et de cobaye ne renferment qu'un dixième du taux de Fibrinolysine contenu dans le plasma humain, alors que le plasma de lapin en contient la moitié. La Fibrinolysine n'a été mise en évidence que dans quelques tissus; ainsi Gluck et Mirsky (28) l'ont caractérisée au niveau de l'endomètre, von Kaulla et Shettles (29) dans la muqueuse de l'utérus. Les travaux de Bjerrehuus (30), de Colgan, Gates et Miller (31), de Damgaard et Ungar (32) ont trait à l'excrétion de la Fibrinolysine dans les urines; d'après ces auteurs, sa concentration varie en rapport avec la quantité d'urine éliminée. Elle disparaît dans les urines après hépatectomie totale; elle augmente par contre après irradiation aux rayons X, dans les chocs anaphylactiques, en général et principalement déclenchés par injection de peptone. D'après Damgaard et Ungar, le choc histaminique reste sans influence sur le taux d'excrétion urinaire de Fibrinolysine. Nous aurons l'occasion de revenir sur ces travaux qui nous intéressent particulièrement.

C'est à Sahli que revient le mérite d'avoir remarqué le premier, en 1885, la propriété lytique de certaines urines, mais ce n'est qu'en 1947 que Nitsche (33) a fait le rapport entre les notions d'urine, de fibrinolyse et de cancer, en constatant l'augmentation très nette des propriétés fibrinolytiques des urines chez les cancéreux.

CHAPITRE II

LES DIFFÉRENTES THÉORIES SUR LA FIBRINOLYSE

Définition de la fibrinolyse:

La Fibrinolysine possède une affinité très forte pour la Fibrine, ce qui explique la facilité avec laquelle un caillot sanguin peut être fluidifié.

Le processus de fibrinolyse physiologique débute dans le sang après la coagulation, c'est une réaction enzymatique qui dégrade la Fibrine en acides aminés et en α- et β-fibrinopolypeptides. Dans la Fibrinolysine extraite des *urines de cancéreux*, c'est l'*alanine* qui prédomine, comme Saladin l'a fait remarquer.

La Fibrinolysine est considérée comme une *protéase* qui existe sous forme de proferment inactif dans le sérum; elle fait partie de la fraction des euglobulines, et migre avec les β-globulines à l'électrophorèse.

Par la méthode de précipitation de Cohn, les deux tiers des β-globulines se trouvent dans la fraction IV et un tiers dans les fractions II et III.

La *Profibrinolysine* se transforme en *Fibrinolysine* par l'intermédiaire d'un activateur. Cette activation est freinée et équilibrée par un agent antifibrinolytique, faisant partie du groupe des *sérines-albumines*. Ce processus a été schématisé par Astrup (34) :

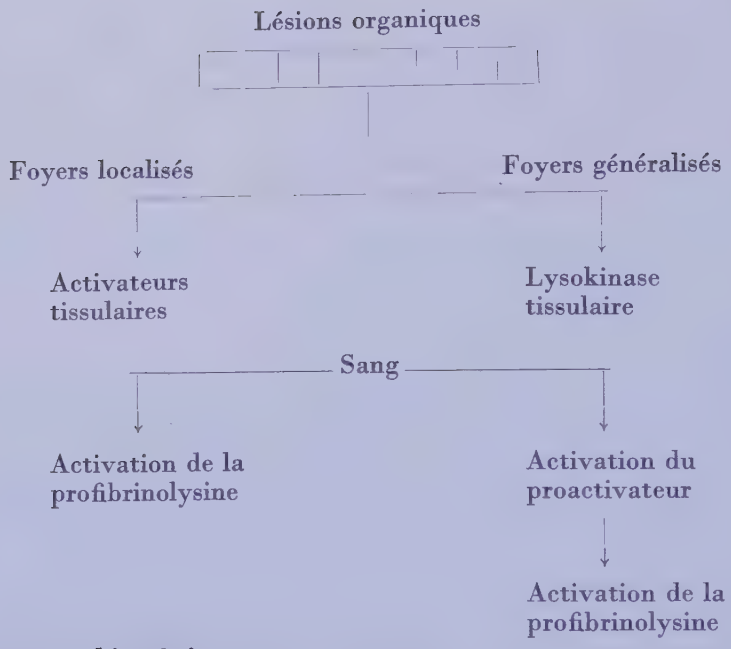
PROFIBRINOLYSINE ⟶ FIBRINOLYSINE

Activateurs : ↑ spontané, Chloroforme, Trypsine, Activateurs tissulaires, Activateurs urinaires

L'activateur lui-même est accéléré par des proactivateurs : Lysokinases.

Activateurs du proactivateur : ↑ spontané, Streptokinase, Kinase tissulaire, Kinase sanguine

Pour illustrer cette activation au niveau tissulaire, nous donnons le schéma suivant :



Théorie stœchiométrique.

Pour Astrup (35) l'activation de la Profibrinolysine par une Fibrinokinase tissulaire est une *réaction stœchiométrique* et non catalytique.

Astrup procède avec une kinase isolée du cœur de porc et a pu constater que la durée d'activation est sans influence. C'est la concentration de la kinase et du proferment qui est déterminante ; *nous serions donc en présence d'une réaction d'équilibre entre la Profibrinolysine et la kinase tissulaire.*

Si l'on remplace la kinase et si on laisse constant le Plasminogène ou Profibrinolysine, la réaction devient de plus en plus active.

Si l'on épuise la kinase par du nouveau Plasminogène, la réaction tend vers une activité nulle. L'augmentation de l'activité varie selon les kinases.

Il existe de plus une activation spontanée qui reste encore inexpliquée. Astrup constate que Profibrinolysine et Fibrinolysine peuvent être en présence sans interaction, et élimine de ce fait l'hypothèse de l'autocatalyse. L'activité totale de l'enzyme dépend de la concentration en kinase et en Profibrinolysine.

(1) Profibrinolysine + Fibrinolysine ⟶
Fibrinolysine + Kinase activée ⟵

La kinase étant insoluble et la Profibrinolysine pouvant être activée par le chloroforme ou spontanément, sans l'addition d'autres compo-

sants, il semble improbable que la kinase se transforme en un produit soluble se composant à la Profibrinolysine.

$$\text{(2) Profibrinolysine } \underset{C1}{\longrightarrow} \text{ Fibrinolysine } \underset{C2}{+} \text{ Blocking Substance } \underset{C3}{}$$

$$\text{(3) Blocking Substance } \underset{C6}{+} \text{ Kinase } \underset{C5}{\longrightarrow} \text{ Composé inactif } \underset{C4}{}$$

Dans cette démonstration *la substance inhibitrice agit comme un inhibiteur spécifique de la Fibrinolysine;* il serait différent de l'inhibiteur du sérum.

En effet, et toujours selon Astrup, le composé résultant de l'action entre Antifibrinolysine et Fibrinolysine tissulaire est décomposé par le sulfate d'ammonium, alors que la Profibrinolysine du sérum est purifiée par traitement répété par le sulfate d'ammonium sans être activée. L'activation spontanée et l'activation par le chloroforme peuvent consister en une dénaturation de la substance bloquante obtenue au cours de la réaction 2. Si cette substance est enlevée, la réaction se fait vers la droite.

Les équations 2 et 3 présentent deux constantes de dissociation :

$$K2 = \frac{C2\ C3}{C1} \qquad K3 = \frac{C5\ C6}{C4}$$

D'après les expériences effectuées par Astrup, il est possible de préparer des mélanges de Fibrinolysine et de proferment qui sont en équilibre avec des kinases à forces différentes. Ceci montre que les exemples peuvent avoir trait à un mélange de kinase libre et de kinase saturée de substance bloquante et transformée en composant inactif.

Si la kinase active et la kinase inactivée sont présentes dans la phase solide en équilibre avec la solution saturée, C4 et C5 sont constants et par conséquence directe, C6 est également constant. Et lorsque l'équilibre en 2 et 3 est atteint, ceci sera vrai pour C3 et C2, et par conséquent C1 sera également constant.

Les expériences donnent l'impression *d'une compétition entre la Fibrinolysine et les kinases pour les substances bloquantes*, ce qui pour la kinase insoluble équivaudrait à une réaction d'adsorption. Il semble que dans l'organisme existe un processus qui contrôle l'équilibre de ce système protéolytique.

Cette hypothèse expliquant *l'équilibre protéolytique* au niveau tissulaire nous semble du plus haut intérêt. Cet équilibre pourrait être rompu dans les cas de cancer, l'organisme réagissant par la formation massive de Fibrinolysine, dont l'excédent serait éliminé par les urines.

Aboulker décrit, en rapport étroit avec ce que nous venons de dire, un syndrome hémorragique avec fibrinolyse, associé au cancer de la prostate.

C'est Tagnon qui, le premier, *a mis en association le cancer de la pros-*

tate et la fibrinolyse, en constatant une *afibrinogénémie* chez un malade présentant un cancer de la prostate avec métastases osseuses. Plus tard, il montrera que dans tous ces cas, il y a déjà forte évolution avec néoplasie métastasique. L'examen humoral confirme le diagnostic, en montrant l'existence d'une fibrinolyse « in *vitro* », se traduisant par une lyse secondaire du caillot; cette lyse n'est pas isolée, elle est toujours accompagnée d'une hypofonction des autres facteurs de coagulation : Prothrombine, Proconvertine, Proaccélérine, dont les taux sont diminués. On note également un déficit en *Ac-globulines*.

Ware et Seegers (37) ont isolé à l'état chimiquement pur une *globuline plasmatique particulière*, laquelle en présence de Thromboplasmine et de calcium accélère la conversion de la Prothrombine en Thrombine. Il s'agit d'une globuline très proche de la Prothrombine et qui serait, comme elle, d'origine hépathique. Les auteurs désignent cette globuline par le terme « *Ac-globuline* » pour souligner qu'il s'agit d'un accélérateur. Ils admettent l'existence de deux *Ac-globulines :* une *plasmatique* et l'autre *sérique*. La première est un *proenzyme* et la deuxième un *enzyme*. *L'Ac-globuline sérique seule accélère la formation de la Thrombine*, elle n'existe pas dans le sang circulant et elle se forme uniquement « *in vitro* » sous l'action de la Thrombine aux dépens de l'*Ac-globuline plasmatique*.

La Thrombine agit même dans un milieu décalcifié; en ajoutant des traces de Thrombine à un plasma oxalaté, on constate l'apparition de l'*Ac-globuline sérique*. Pour Ware et Seegers, en présence de la Thromboplastine et du calcium, la conversion de la Prothrombine peut avoir lieu même en l'absence de l'Ac-globuline; toutefois, dans ce cas, elle est très lente. *L'Ac-globuline agit ainsi comme accélérateur, sans que sa participation soit indispensable*. En présence d'un taux constant de Prothrombine, de Thromboplastine et de calcium, la vitesse de conversion de la Prothrombine est fonction du taux de l'Ac-globuline sérique.

L'*Ac-globuline plasmatique* a un taux relativement constant chez toutes les espèces, alors que celui de l'*Ac-globuline sérique* est variable suivant l'espèce animale. Chez l'homme le taux est très faible, ce qui explique la conversion relativement lente de la Prothrombine.

L'*Ac-globuline sérique* semble être l'équivalent du *facteur VI d'*Owren et l'*Ac-globuline plasmatique* celui du *facteur V*.

En résumé, il existe un facteur ou un groupe de facteurs plasmatiques : *facteur V d'*Owren, *Ac-globulines de* Seegers et *facteur labile de* Quick, qui interviennent dans les conversions de la Prothrombine.

On peut par conséquent admettre que la fibrinolyse est probablement due à l'activation d'un facteur plasmatique inactif (la Profibrinolysine ou Plasminogène) par un enzyme (la Profibrinokinase) qui la transforme en Fibrinolysine ou Plasmine active. C'est le cas pour les fibrinolyses aiguës.

Ce processus dépend secondairement de la modification des autres

facteurs intervenant dans la fibrinolyse, tels que Prothrombine, Proconvertine, Proaccélérine et des Ac-globulines plasmatiques et sériques.

La fibrinolyse prostatique relève-t-elle d'une activité fibrinolityque directe ? Tagnon montre que le tissu néoplasique d'origine prostatique possède une activité protéolytique comparable, que l'extrait soit préparé à partir de la tumeur elle-même ou des lésions métastasiques.

Théorie catalytique.

Cette théorie fait appel à des éléments n'intervenant que comme catalyseurs et n'entrant pas dans les réactions elles-mêmes; parmi ces différentes kinases, il faut noter l'*Urokinase*, la *Strepto-* et *Staphylokinase* et des *Fibrinokinases* d'origine tissulaire.

Alkjaersig (38) décrit la cinétique de l'activation de la Profibrinolysine par la Trypsine, la Streptokinase et l'Urokinase. Selon cet auteur, la réaction est catalytique, elle inclut la perte d'une partie de Profibrinolysine. Les résultats sont différents selon que l'on utilise l'Urokinase ou la Streptokinase.

Au point de vue clinique, l'*Urokinase* lyse l'ester de la lysine et de l'arginine. Il semblerait que l'activateur, dans chaque cas, est un enzyme capable d'hydrolyser ces esters, ceux-ci étant considérés comme des inhibiteurs compétitifs de la réaction.

Ces expériences tendent à montrer que la conversion par activateur est de nature purement enzymatique.

Théorie de l'activation autocatalytique.

D'après cette théorie, la Profibrinolysine suivrait le processus général d'activation des enzymes protéolytiques irréversibles, *du type trypsinogène.*

L'action de l'Urokinase serait analogue; pour la Streptokinase il faudrait un cofacteur qui pourrait être une partie de la Fibrinolysine résultant d'une autocatalyse spontanée.

Le problème de l'autocatalyse se pose surtout depuis que l'on est capable de préparer une Fibrinolysine débarrassée d'activateur. Cette activation spontanée a été étudiée par Delezenne et Loomis (39) qui ont employé cette préparation privée d'inhibiteur.

Sans vouloir entrer dans des descriptions purement physiques et chimiques qui sortent du cadre de notre travail, signalons que c'est en étudiant ce problème de l'autocatalyse que les progrès les plus sensibles ont été réalisés dans la préparation de la Fibrinolysine, grâce à l'extraction acide de Kline et la stabilisation au moyen du glycérol à 50 %, qui ont permis d'aboutir à l'obtention d'une Fibrinolysine aussi pure que le proferment initial.

Pour d'autres auteurs, tel UNGER et SHAPIRO (40) l'activation de la Profibrinolysine se ferait selon une réaction antigène-anticorps, ou par l'intermédiaire d'agents anaphylactogènes tels que peptone, Tween 20, morphine, acétylamine. UNGER a essayé de le démontrer en faisant appel à la Streptokinase et à un sérum chauffé à 56°, donc débarrassé de son complément et ne pouvant par conséquent être activé que par la Streptokinase.

L'activation de la fibrinolyse en thérapeutique:

Une activation du système fibrinolytique a été recherchée pour la thérapie des thrombo-embolies. La thérapie au moyen des anticoagulants tels que l'Héparine ou les dérivés de la Coumarine inhibent uniquement l'accroissement des thrombus, sans agir sur le système fibrinolytique. Or, dans les cas à pronostic défavorable, tels que les *infarctus du myocarde*, les obstructions vasculaires cérébrales ou des grands vaisseaux périphériques, il faudrait recourir à une thérapie fibrinolytique active.

On a essayé de résoudre ce problème de diverses manières: ainsi EICHENBERGER et ses collaborateurs (41) ont tenté les premiers d'activer la fibrinolyse d'une façon non spécifique, par injection intraveineuse de *pyrogènes bactériens*. Les bons résultats qu'ils ont obtenus ont été confirmés par la suite et ont conduit à l'emploi d'un pyrogène, le *Pyrexal*, constitué par des lipopolysaccharides de *Salmonella abortus (Laboratoires* WANDER, *Berne)*. Cependant, cette médication avait l'inconvénient de provoquer une fibrinolyse dont la durée était limitée à 90 minutes, accompagnée d'une forte poussée pyrétique et d'un affaiblissement de l'état général, comme SALADIN l'a rapporté.

WEINER *et ces collaborateurs* (42) ont constaté que la thérapie pyrétique pouvait être avantageusement remplacée par l'injection de fortes doses d'*Acide nicotinique* : des doses de 10 mg sont facilement supportées et ne provoquent aucune modification métabolique. Immédiatement après l'injection, on doit noter une sensation de chaleur intense *(Flush)* qui est la condition essentielle de l'activation de la fibrinolyse. Ce symptôme débute environ 3 minutes après l'injection, l'optimum de la fibrinolyse est atteint après 12 à 15 minutes, et la fin se manifeste 20 à 25 minutes après l'injection.

Cependant, un grand nombre de malades reste réfractaire à ce traitement et le phénomène lytique ne se manifeste pas, ce qui constitue évidemment un inconvénient majeur de cette vitaminothérapie.

Dans la thérapeutique actuelle, on a surtout recours à la *Streptokinase* en injection intramusculaire pour éviter tout risque d'accident. Habituellement, on injecte 10 000 unités dissoutes dans 0,5 ml de soluté physiologique, à raison de 2 injections par jour pendant 3 à 6 jours.

L'emploi de la Streptokinase présente cependant un inconvénient : par ses propriétés antigéniques, elle engendre la formation d'*Antistreptokinases*.

Ces derniers temps, des produits nouveaux contenant plusieurs ferments activants et pouvant être injectés par voie veineuse ont été mis dans le commerce.

Pour éviter l'action toxique de la *Streptokinase*, différents auteurs ont combiné ce traitement avec des perfusions de *Fibrinolysine* préparée à partir de plasma humain dont la Profibrinolysine a été activée « *in vitro* ».

Von Kaulla recommande une perfusion de plasma idiogène, dans lequel la *Profibrinolysine* a été activée préalablement par des urines du malade pour être transformée en *Fibrinolysine active*. Andrus et ses collaborateurs (43) ont employé le Chloroforme pour cette activation. Cliffton (44) a traité une quarantaine de malades atteints de processus thrombo-emboliques au moyen de perfusions de Fibrinolysine préparée par activation « *in vitro* » *au moyen de Streptokinase*, ce procédé permettant d'éviter les accidents graves; cependant chez quelques malades on a enregistré de la fièvre, des frissons et une chute de la tension.

Une *Fibrinolysine* hautement purifiée, préparée aux U.S.A. par activation au moyen de *Streptokinase*, a donné récemment de très bons résultats à Singher et Shapple (45) : il s'agit de l'*Actase*, dont la posologie moyenne est de 25 000 à 250 000 unités par jour en perfusions.

Mac Farlane et Pilling (46) ont employé, en 1946 déjà, un système fibrinolytique isolé de l'urine: cependant, d'après Williams (47), il ne s'agirait pas d'une *Fibrinolysine*, mais d'un activateur complet et hautement actif de la *Profibrinolysine*, et qu'il a appelé « *Eurokinase* ». Son importance clinique est très grande, puisqu'il est capable de redissoudre rapidement en présence de *Profibrinolysine* les caillots sanguins apparus dans les voies urinaires par suite d'hémorragies rénales ou d'autres cas d'hématuries.

Cet activateur urinaire est absorbé quantitativement à la Fibrine, et lors du processus d'activation il disparaît complètement, ce qui semble confirmer la théorie de l'activation selon une réaction stœchiométrique, théorie que nous avons énoncée plus haut.

Un principe d'activation semblable a été mis en évidence dans le lait humain. Le rôle de ce système fibrinolytique est identique, pour le lait, à celui de l'Urokinase pour les voies urinaires, et évite par conséquent l'apparition de mastidites. On a découvert des systèmes d'activations analogues dans les larmes, la salive et le sperme.

Après avoir passé en revue les différentes théories de la *fibrinolyse et de son activation*, il convient maintenant de mentionner une autre partie de cette réaction, l'inhibition, c'est-à-dire l'*antifibrinolyse*.

Données actuelles sur l'antifibrinolyse:

Le freinage du processus fibrinolytique est provoqué par des inhibiteurs. Le sérum et, dans certain cas, les urines contiennent un inhibiteur spécifique : l'*Antifibrinolysine*, dont l'action se manifesterait sous

deux formes : d'une part, *inhibition indirecte*, par l'intermédiaire de divers agents tels que la Cortisone et l'ACTH, qui sont considérés par Ungar et Damgaard (48) comme des inhibiteurs non spécifiques ; après traitement par ces médicaments, on constaterait une augmentation de l'action antifibrinolytique du sérum.

D'autre part, il existerait *une action directe Fibrinolysine-Antifibrinolysine* qui agirait de façon spécifique selon un schéma antigène-anticorps.

Nous avons déjà parlé de l'action activante de la Trypsine, et il existe un inhibiteur thermolabile de ce ferment qui est détruit par le Chloroforme. On considère cet inhibiteur comme une fraction labile de l'*Antifibrinolysine* qui serait liée à la fraction sérine-albumine.

La solution isoélectrique de *globulines* contient également un ou plusieurs inhibiteurs qui sont labiles. D'autre part, on a décelé dans les urines deux inhibiteurs stables que l'on peut précipiter ; l'un de ces facteurs migre à l'électrophorèse avec les α_1-globulines, l'autre avec les α_2-globulines : ce dernier paraît agir très fortement sur la *Profibrinolysine* même activée par la *Streptokinase*.

Un autre inhibiteur a été mis en évidence dans les *thrombocytes*. Il est soluble dans l'eau et le soluté physiologique et peut être précipité par une solution saturée de Sulfate d'ammonium. Il est sans influence sur le processus de coagulation même.

Les recherches les plus importantes sur l'inhibition de la fibrinolyse ont été effectuées par Norman (49) qui, le premier, a suggéré l'existence de deux inhibiteurs, l'un rapide mais labile, l'autre lent et agissant à certaines concentrations. Il a découvert ces éléments dans les fractions 5 et 4 de Cohn, et les a séparés par migration électrophorétique, en les désignant par les termes α_1 et α_2. L'élément α_1 labile migre avec les α_1-globulines, il se combine de façon non dissociable avec la *Fibrinolysine* à une concentration qui dépend essentiellement de la température réactionnelle.

L'élément α_2, plus résistant, migre avec les α_2-globulines et se combine de façon dissociable et indépendante de la température.

Norman a pu déceler l'existence de ces inhibiteurs en mettant en présence du sérum ou du plasma humain normal et une solution de *Fibrinolysine* dans un système coagulant. Ce phénomène est illustré par le schéma ci-contre.

La quantité d'*Antifibrinolysine* varie avec la provenance, de diverses espèces animales, du plasma.

La forte teneur en *antiferment* du sérum de lapin a été mis en évidence par Christensen (50). La lyse du système coagulant utilisant ce sérum n'est obtenue qu'après adjonction de *Fibrinolysine humaine* à forte concentration. Ou inversement, si l'on ajoute à un système coagulant une certaine quantité de sérum de lapin, on constate une augmentation du temps de lyse. Christensen a mis au point une technique permettant l'élimination de l'inhibiteur du sérum de lapin.

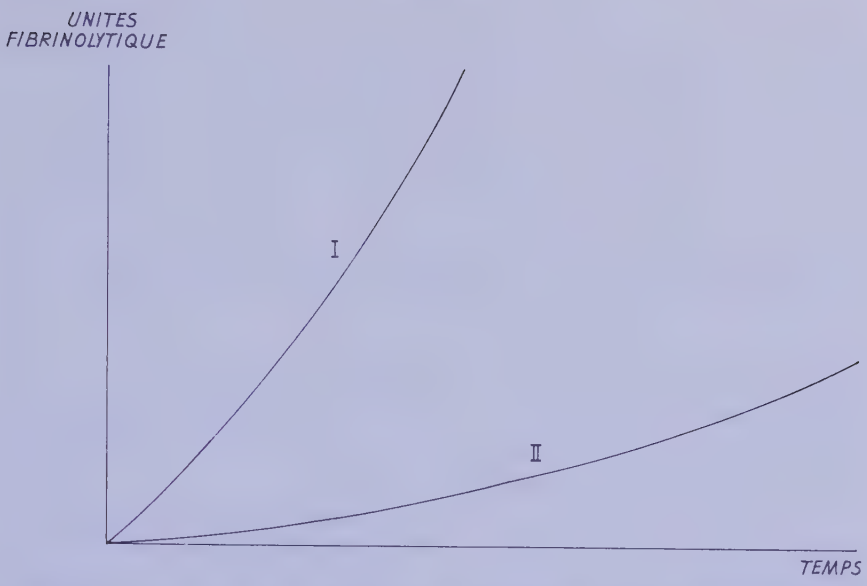


Fig. N° 1 — Graphique illustrant l'existence d'inhibiteurs de la Fibrinolysine dans le plasma ou sérum humain normal (d'après NORMAN)

Von KAULLA a également décrit l'inactivation de l'inhibiteur du ferment fibrinolytique. Des expériences sur différentes espèces animales démontrent que la teneur en *Antifibrinolysine* varie selon qu'il s'agit de sérum humain, de cheval, de porc, de lapin ou de cobaye.

Pour un système coagulant auquel on ajoute une certaine quantité de *Fibrinolysine* contrôlée, von KAULLA obtient une lyse en 5 minutes. En laissant ce système coagulant en contact avec un sérum humain, la lyse ne se fait plus qu'après 45 minutes; avec du sérum de cheval, elle a lieu après 55 minutes; avec du sérum de porc, elle se produit après 315 minutes et en présence du sérum de bœuf, après 295 minutes. L'adjonction de sérum de lapin ou de cobaye empêche la lyse, l'inhibition de la *Fibrinolysine* est totale.

Ces données expérimentales intervenant directement dans la suite de nos travaux, il nous a semblé indispensable de les exposer ici.

Von KAULLA a pu démontrer de plus que cette action inhibitrice des différents sérums s'élève avec une concentration croissante et qu'elle augmente également en rapport direct avec le temps de contact, tel qu'il ressort du tableau ci-après.

L'action de cet inhibiteur peut être réduit par la chaleur, par un traitement aux ultrasons, par le Sulfate de cuivre, par le Sulfate de protamine. Un sérum de lapin normal inhibe en 5 minutes toute action lytique, alors que traité au Sulfate de protamine, il ne présente plus cette activité inhibitrice.

TABLEAU N° 1

Sérum en ml	Temps de contact	Fibrinogène à 0,6 %	Fibrinogène à 0,3 %
		Temps de lyse	Temps de lyse
0,1	0′	2′16″	2′
0,3	0′	18′	13′
0,5	0′	80′	40′
0,1	30′	6′	5′
0,3	30′	110′	23′
0,5	30′	négative après 9 heures	75′

Le temps de lyse peut d'autre part être rallongé par divers colorants, tels que le Bleu-Geigy, le Rouge neutre, l'Acridine.

Pour compléter l'étude de *cet antiferment*, nous tenons à donner ici deux méthodes de dosage de l'*Antifibrinolysine du plasma*.

La première de ces méthodes a recours au plasma et elle est basée sur la technique de TILLETT (51); elle est effectuée de la façon suivante :

Plasma ..... 0,1 ml
Bouillon de culture de Streptocoque fibrinolytique . 0.25 ml
Solution de chlorure de calcium à 0,25 % ..... 0,25 ml

On peut également introduire de la Thrombine. Agiter soigneusement et disposer au bain-marie à 37°. On contrôle la liquéfaction du caillot à des intervalles de 20 à 30 minutes, de 1 à 4 heures. de 4 à 8 heures. de 8 à 16 heures.

On peut encore procéder de la façon suivante :

On introduit des doses progressivement croissantes de *Fibrinolysine* dans 0,1 ml de plasma; on ajoute 0,25 ml de Thrombine et on complète à 1,2 ml à l'aide de soluté physiologique. Après coagulation, on dispose à 37° et après 24 heures, on procède à la lecture pour déterminer le tube où l'*Antifibrinolysine* a neutralisé la *Fibrinolysine*.

La seconde méthode a recours au sérum : On introduit dans une série de tubes des doses constantes de *Fibrinolysine et de Thrombine* et 0,1 ml d'un plasma standard; on ajoute ensuite des doses progressivement croissantes du sérum à examiner et on complète au même volume avec du soluté physiologique. Après 24 heures de séjour à 37° on peut déterminer la dose minimale de sérum inhibant la fibrinolyse.

Après avoir ainsi donné les généralités sur la Fibrinolyse, les réactifs essentiels entrant en jeu dans ce processus biologique et leurs principaux facteurs activants et inhibiteurs, nous allons maintenant essayer de résumer les travaux ayant eu trait à l'isolement et la préparation de la *Fibrinolysine et la Profibrinolysine*.

CHAPITRE III

PRÉPARATION DE LA FIBRINOLYSINE ET DE LA PROFIBRINOLYSINE

Après avoir passé en revue les diverses théories sur la fibrinolyse et sur le rôle de l'Antifibrinolysine, il nous semble indispensable d'exposer quelques données sur la préparation de la *Fibrinolysine et de la Profibrinolysine.*

Préparation de la Fibrinolysine:

Comme nous l'avons indiqué antérieurement, la *Fibrinolysine* se trouve dans la fraction III/3 de COHN. TILLETT et GARNER (52) indiquent une méthode de précipitation qui pourrait être employée pour isoler la *Fibrinolysine* à partir de sérum ou d'urine.

A ce sujet, on mélange soigneusement un filtrat d'urine actif (2 500 ml) et un gel d'hydroxyde d'alumine préparé à partir de 250 g de Sulfate d'alumine: le mélange est disposé pendant 1 heure à 37° 5 en agitant souvent. On sépare l'Hydroxyde d'alumine par centrifugation; on suspend le culot dans 1 000 ml de soluté physiologique en agitant soigneusement, puis on centrifuge. La solution saline surnageante renferme une notable quantité de pigments, mais n'est pas fibrinolytique. Le gel est lavé à deux reprises, d'abord avec le soluté physiologique, puis avec de l'eau distillée. On triture ensuite l'Hydroxyde d'alumine dans une solution tampon de phosphate de sodium à 0,1 mol. (500 ml). La solution tampon est préparée de la façon suivante :

On dissout 35,8 g de Phosphate disodique dans 900 ml d'eau distillée. On ajuste à pH = 7,3, en ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique concentré, puis on complète à 1 000 ml au moyen d'eau distillée.

La suspension d'Hydroxyde d'alumine est conservée à 37° 5, puis centrifugée. Le liquide surnageant a un pouvoir fibrinolytique très prononcé. Le résidu de la suspension d'Hydroxyde d'alumine est élué encore deux fois de la même façon, puis on réunit les trois liquides d'élution et on filtre à travers un filtre Berkefeld. Les 1 500 ml de filtrat limpide hautement actif sont ensuite concentrés à 50 ml dans le dialysateur de SIMMS. Cette dialyse demande au moins 16 heures. Il faut donc, pour maintenir l'asepsie, ajouter une petite dose de Toluène.

L'extrait concentré est légèrement brunâtre et possède une action fibrinolytique très forte. Finalement, on le déshydrate complètement au

moyen du vide sur Anhydride phosphorique. La poudre obtenue est formée de petites écailles brun foncé, soluble dans 5 ml de soluté physiologique.

Rocha et Silva (53) ont élaboré une technique basée sur la précipitation isoélectrique à pH = 5,5 d'un sérum dilué à 1/10 dans l'eau distillée. Le pH est ajusté à l'aide d'Acide acétique dilué. On laisse déposer une nuit à la glacière, on centrifuge, on redissout le dépôt dans un tiers du volume initial au moyen d'une solution de Chlorure de sodium à 1 % et en neutralisant par addition d'une solution de NaOH N/10. Le soluté ainsi obtenu est activé au moyen de Chloroforme, à la dose de 1/10 du volume initial. On laisse reposer pendant 3 à 4 jours à la température du laboratoire. On décante le Chloroforme et la fraction aqueuse est diluée avec 10 volumes d'eau distillée. On vérifie le pH qui doit être compris entre 5,3 et 5,5. On laisse à nouveau déposer à la glacière. On dissout le précipité dans 1/5 du volume de la solution saline: on neutralise pour obtenir une solution activée de globulines. La *Fibrinolysine* est précipitée au moyen de solution à 25 % et 37 % de Sulfate d'ammonium: le dernier précipité fractionné est séparé après un repos d'une heure; il est remis en solution et on dialyse, puis on congèle après neutralisation.

Les auteurs recommandent une délipidation préalable du sérum. Ils illustrent le rendement par le tableau suivant :

TABLEAU N° 2

Réactifs en ml	Tubes N°				
	1	2	3	4	5
Solution activée	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Solution saturée de Sulfate d'ammonium	5,0	6,0	7,0	8,0	10,0
Solution saline à 1 %	5,0	4,0	3,0	2,0	0,0
Concentration en sulfate d'ammonium	25 %	30 %	40 %	40 %	50 %
Force lytique.....	42	30	11	—	—

On peut préparer des *Fibrinolysines* plus pures, en employant la technique de Loomis, George et Ryder. Le sérum est tout d'abord absorbé sur l'Hydroxyde de magnésium, puis précipité au moyen de Sulfate d'ammonium à la concentration de 25 %, puis de 29 %. Le deuxième précipité est dissous dans l'eau distillée, activé avec du Chloroforme pendant 48 heures, puis on décante et on neutralise. On centrifuge et le précipité est dissous dans une solution saline fortement diluée, puis on reprécipite

par voie isoélectrique à pH = 5,5. Le dépôt ainsi obtenu est remis en solution dans une petite quantité d'eau distillée, puis lyophilisé pour la conservation.

Von Kaulla a mis au point une méthode permettant d'obtenir une préparation encore plus pure, en utilisant la stabilité de la *Fibrinolysine* en milieu acide. Il précipite les Euglobulines par un courant d'Anhydride carbonique, puis les traite avec une solution d'Acide acétique N/10, puis il ajuste le pH à 1,0 — 1,2 au moyen d'Acide chlorhydrique. Pour plus de détails, nous renvoyons à Deutsch (page 183) où l'on trouve également des détails sur la préparation de la *Fibrinolysine stérile et injectable*, d'après la méthode de Fletcher.

Préparation de la Profibrinolysine:

Parmi les différentes techniques, nous tenons à en décrire deux des plus actuelles.

Dans la méthode de Kline on part de la fraction III/3 de Cohn. On procède à une extraction initiale au moyen d'une solution d'Acide sulfurique 0,05 N pendant 20 minutes à la température du laboratoire, puis on centrifuge à 2 500 t/mn pendant 10 minutes. Le surnageant est ajusté à pH = 11,0 au moyen de NaOH N maintenu pendant 3 minutes au maximum, puis on ramène à pH = 5,3 par l'HCl N. On dispose à la glacière pendant 3 heures, puis on abaisse le pH à 2,0 par l'HCl N et on centrifuge pendant 1 heure à 2 700 t/mn. Le surnageant est constitué par une solution de proenzyme appelée « *solution A* ». Celle-ci est à nouveau soumise à une dernière purification en amenant une nouvelle fois le pH à 8,6 par la solution du NaOH N. On dialyse dans une solution tampon de Phosphate trisodique à pH = 6,0. Le contenu du sac de dialyse est disposé pendant une heure à la glacière, puis centrifugé. Le résidu constitué par la *Profibrinolysine ou Plasminogène*, est dissous dans l'eau distillé et mis à cristalliser à pH = 8,2 d'après la technique de Milstone (55).

Plus rapide, mais moins pure, la *Profibrinolysine* est obtenue par précipitation des globulines et dissolution de celles-ci dans 2,5 volumes de solution tampon de Véronal-sodique, d'après Owren, contenant 0,15 % d'Oxalate de sodium.

Propriétés physico-chimiques de la Fibrinolysine.

La *Fibrinolysine* est un enzyme protéolytique dont le poids moléculaire est de 143 000 ; son point isoélectrique est à 6,2 (5,6 pour la *Profibrinolysine*).

Pour Alkjaersig, la *Fibrinolysine* représente 0,10 % des protéines totales, elle est formée de composés azotés, de Phosphore, de Tyrosine, de Tryptophane et d'Hexose.

Ses principales propriétés sont : l'activité protéolytique (hydrolyse de la Caséine), l'activité fibrinolytique sur le *Fibrinogène*, son activité estérasique sur le « BAM_e » *(Benzoyl-Arginine-Méthyl-ester)* et sur le « LE_e » *(Lysine-Ethyl-ester)*.

Susceptible d'être activée, cette réaction se fait dans certaines conditions optimales : pH = 7,6 dans le tampon phosphaté 0,05 mol, en l'absence d'ions Cu et Zn, ces métaux inhibant la réaction. Le Calcium, le Magnésium et le Manganèse n'interviennent que légèrement.

La *Fibrinolysine* obtenue à partir du proferment renferme toujours une certaine part soluble dans l'Acide trichloracétique, dont le taux est en rapport direct avec la quantité de *Fibrinolysine* formée. La réaction se traduit par une courbe en S, spécifique d'une réaction autocatalytique.

Le Glycérol semble être le meilleur stabilisateur de ce ferment : il empêche la dénaturation du système enzymatique, fait que l'on peut mettre en évidence en dosant l'activité fibrinolyrique en présence de *Streptokinase*. Il faut cependant mentionner que celle-ci n'agit que sur la *Profibrinolysine humaine* et reste inactive envers le proferment d'origine bovine.

Dosage de l'activité protéolytique.

La technique la plus utilisée est celle d'Elsner (56) qui s'effectue de la manière suivante :

Solution de Fibrinolysine en expérience	1,0 ml
Solution tampon de Véronal sodique	0,8 ml
Solution de Caséine à 5%	0,3 ml
Solution de Streptokinase à 330 U ml	0.2 ml

On dispose pendant 15 minutes au bain-marie à 37 ° pour transformer la *Profibrinolysine en Fibrinolysine*.

A ce moment, on introduit encore 3,7 ml d'une solution de Caséine à 5% en agitant. Après 2 minutes, on prélève 1 ml. on y ajoute 8 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 5% pour précipiter les protéines; on laisse reposer pendant 20 minutes, puis on filtre. Le filtrat contient la Tyrosine acido-soluble.

Pour le dosage proprement dit, on dispose le substrat réactionnel pendant 1 heure au bain-marie à 37° et on procède de nouveau au dosage de la Tyrosine.

Employant une méthode similaire Remmert et Cohen définissent arbitrairement l'unité protéolytique de la façon suivante : en employant comme substrat une solution à 4% de Caséine dégradée pendant une heure en présence de l'enzyme, on doit obtenir une augmentation de la Tyrosine acido-soluble se chiffrant au minimum à 450 γ.

Dans le chapitre suivant, nous allons étudier le rapport entre le taux de *Fibrinolysine urinaire et le cancer prostatique.*

CHAPITRE IV

FIBRINOLYSINE ET CANCER

Parmi les réactions mettant en jeu le phénomène lytique, citons la réaction de protéolyse de Fuchs (57) et Nitsche.

Fuchs a mis en évidence l'existence d'une réaction entre un sérum et une fibrine d'origines différentes, par exemple entre le sérum de veau et la fibrine de sang de cheval. Cette réaction amène une augmentation du taux d'azote dialysable qu'il est impossible de déceler en mettant en jeu une fibrine et un sérum homologue : L'auteur admet que cette augmentation d'azote provient de la dégradation de la fibrine par l'intermédiaire d'un enzyme protéolytique à propriété spécifique de l'espèce.

Fuchs a pu constater également l'existence d'un enzyme spécifique dans le sérum de cancéreux, qui se différencie ainsi du sérum sain. En effet, le sérum de cancéreux provoque une augmentation du taux d'azote à partir de fibrine de sujets sains, alors que ce phénomène ne se manifeste pas en présence de fibrine de cancéreux. Cependant, cette réaction est réversible, puisque la fibrine d'origine cancéreuse réagit de la même façon avec le sérum sain.

Fuchs prétend pouvoir déceler de cette façon des cas de cancer avec plus de 90 % de précision. A la suite de ces publications, un grand nombre d'auteurs ont éprouvé la méthode de Fuchs.

C'est ainsi que Nitsche a découvert dans les urines de cancéreux un enzyme lysant la fibrine animale en milieu acide et en présence d'ions calcium. En se basant sur ce fait, il a élaboré une technique de diagnostic précoce du cancer par caractérisation chromatographique des acides aminés libérés, en employant la Ninhydrine comme révélateur. Cependant, dans une étude critique, Beckmann (58) estime que le test de Nitsche, comme d'ailleurs bien d'autres réactions, ne peut pas être considéré comme un test de diagnostic précoce de cancer. Pour être admise comme telle, et d'après les données théoriques de Dumm et Greenhouse (59), une méthode doit donner au minimum 90 % de résultats concordants et au plus 5 % de réactions faussement positives.

Or, de l'aveu même de Nitsche sa réaction n'est pas spécifique des cancers, car elle peut également se révéler positive chez des patients non cancéreux (femmes enceintes, malades atteints de fractures) et même chez des sujets sains. L'auteur conclut que sa technique doit être consi-

dérée comme un test de premier dépistage, dont la positivité indique la nécessité de recherches plus approfondies.

Quoi qu'il en soit, ALBERS, MERKEN et MUCKE (60) mentionnent douze auteurs qui déclarent le test de FUCHS utilisable en clinique. Le caractère protéolytique des tumeurs cancéreuses est actuellement une donnée bien connue. HIMBERG montre l'intérêt d'une recherche dans le domaine de la fibrinolyse, au point de vue diagnostic du cancer. TAGNON insiste surtout sur le caractère fibrinolytique des *tumeurs de la prostate* excrétant un enzyme capable de lyser fibrinogène et fibrine, comme nous l'avons déjà vu. BERNICK, ainsi que MULLERTZ (61) ont observé le même phénomène dans des cas de cancer de l'estomac. COHN et HODGSON rapportent que le taux de fibrinogène est toujours effondré chez les malades atteints de carcinome avancé.

Pour SOULIER (62), la physiopathologie de la fibrinolyse est loin d'être élucidée. *Pour la prostate*, il y a lieu de noter que cette glande sécrète normalement un suc doué d'une activité protéolytique qui est fortement accrue en cas de cancer. Cet accroissement de l'activité protéolytique est encore plus net dans les *cas de cancer associé à des métastases osseuses multiples*, qui constituent autant de points de diffusion de l'enzyme protéolytique. Selon SOULIER il s'agirait ici, et dans le cas précis de la *fibrinolyse prostatique*, du passage dans la circulation sanguine d'un enzyme directement activé. La présence, toujours excessive dans ces cas, de la *Profibrinolysine et de l'antiferment* correspondant dans la fraction des γ-globulines permet de supposer la formation d'un complexe *Antifibrinolysine-Fibrinolyse* qui serait dissocié au niveau du rein, lequel sécréterait la *Fibrinolysine* et retiendrait l'*antiferment* à poids moléculaire élevé. La faible activité lytique de l'urine normale serait due à un effritement tissulaire normal. L'activité protéolytique augmenterait rapidement avec les lésions néoplasiques.

D'après COLGAN la mesure de l'activité fibrinolytique de l'urine peut être considérée comme la suite d'une activation de la *Profibrinolyse « in vivo »*. C'est sur cette affirmation que reposent les travaux de NITSCHE, repris par GREGO et SALADIN.

Sans vouloir préjuger de la nature du facteur excrété par les urines cancéreuses, ARON (64) démontre la présence d'une substance spécifique.

« Tout se passe comme si cette urine contenait un *antigène spécifique* susceptible de provoquer la formation d'*anticorps* dans le sang des sujets auxquels il était administré » affirmait ARON à propos de l'injection d'urine cancéreuse à des lapins. En employant le terme d'antigène, ARON ne veut préjuger ni de la nature du produit, ni de son origine. Est-il produit par la tumeur même ou par quelque autre tissu, sous l'influence de la tumeur? S'agit-il d'un *antigène* provenant d'un microbe, d'un virus ou d'un produit de catabolisme de la cellule néoplasique? Autant de questions qui sont sans réponse jusqu'à ce jour.

Toujours est-il que l'expérience que nous venons de rapporter conduit à l'hypothèse de la possibilité d'une application sérologique : C'est que

chez l'homme cancéreux le milieu idiogène est susceptible de renfermer les mêmes anticorps que l'on fait apparaître expérimentalement chez l'animal traité par un extrait d'urine de cancéreux.

Ces observations nous incitent à faire un rapprochement entre le *facteur antigénique* d'Aron et l'*élément fibrinolytique* sur lequel est basée la réaction de Nitsche. Comme nous l'avons vu précédemment, cet auteur publie une statistique donnant 83,3 % de résultats positifs. Les meilleurs résultats sont obtenus dans les cas de cancers uro-génitaux, du rectum et de la prostate.

Grego qui a repris cette étude, suppose qu'au point de vue physiologique, l'*enzyme fibrinolytique* apparaît surtout dans les cas de tumeurs profondes, alors que celles localisées sur le système glandulaire et épithélial l'élaborent en plus faibles proportions.

D'autres études sur la *propriété lytique des sarcomes et l'activité protéolytique des tumeurs* sont rapportées par Cliffton, qui explique la fibrinolyse comme une réaction de défense empêchant la fixation des cellules des tumeurs à la faveur des caillots. L'auteur décrit une diminution des métastases dans un carcinome de lapin par *injection de fibrinolysine*.

Cliffton étudie l'activité lytique des tumeurs par la méthode des plaques de fibrine : Les tissus à éprouver sont mis en contact avec de la fibrine pendant une durée de 15 minutes à 3 heures. D'autre part, on introduit de la *Profibrinolysine* dans une série d'expérience, afin d'étudier l'éventuel pouvoir activateur des tissus cancéreux sur ce proferment. C'est ainsi que Cliffton a pu démontrer que le *cancer mammaire* est dépourvu d'activité lytique directe, mais possède le pouvoir d'activer le proferment. Il arrive à la conclusion, partagée par Grego, que les *cancers épithéliaux* sont très peu actifs, alors que les *sarcomes* présentent une très forte activité lytique.

Les études les plus complètes et les plus récentes sur le *cancer et la Fibrinolysine* ont été effectuées par Louise Lang-Phillips. Cet auteur a étudié trois groupes de cas : Un *premier groupe* d'individus sains, un *second* comprenant des malades avec un diagnostic clinique d'hypertrophie bénigne de la prostate. Le *troisième groupe* a trait à des malades présentant un cancer de la prostate biologiquement affirmé, parmi lesquels un grand nombre sont porteurs de métastases.

L'étude biologique porte sur le *Fibrinogène*, la *Profibrinolysine* totale et libre, les *Antifibrinolysines*, ainsi que sur les densités optiques à différentes longueurs d'ondes des produits de la précipitation par l'Acide trichloracétique acido-solubles. L'auteur a reporté les résultats de ses investigations dans des tableaux. La comparaison de ces trois groupes de sujets montre, pour les patients atteints de *cancer de la prostate*, une très nette augmentation des densités optiques, mettant en évidence la forte activité fibrinolytique chez ces malades, activité qui augmente encore avec l'étendue de la maladie.

Par la suite Lang-Phillips a appliqué sa technique à *divers autres can-*

cers et a constaté une même augmentation des densités optiques, ce qui prouve que ce test n'est pas applicable aux cancers de la prostate seulement.

Pour clore ce chapitre, rapportons encore l'étude de la *Fibrinolysine* dans les urines saines et cancéreuses par SALADIN :

Cet auteur a tout d'abord essayé de standardiser son système fibrinolytique. Pour ce faire, il a précipité 1000 ml d'urine provenant de 6 personnes saines pour obtenir la Fibrinolysine, qui a été déshydratée dans le vide à une température inférieure à 30°, jusqu'à obtention d'une poudre brunâtre qui a été pesée et partagée en dix parts égales, de sorte que chaque fraction correspondait sensiblement à la *Fibrinolysine* de 100 ml d'urine saine. Ces échantillons ont été introduits dans des ampoules qui sont scellées sous vide; des contrôles ont permis de constater que l'enzyme, conservé pendant plusieurs semaines à 6° ou à la température ambiante, restait encore actif. Cependant, l'extrait conservé n'agit que dans les réactions d'une durée ne dépassant 6 heures, c'est pourquoi SALADIN a préféré par la suite travailler avec des extraits fraîchement préparés. Il a préparé de la même manière des extraits provenant d'*urines de personnes cancéreuses* pour étudier la différence éventuelle de l'activité enzymatique de ces deux sortes d'extraits.

Au point de vue de l'*activité fibrinolytique générale*, SALADIN a pu constater que sur 28 extraits urinaires cancéreux, 19 donnaient une réaction fibrinolytique plus forte et plus rapide que les extraits provenant d'un mélange d'urines saines, d'urines tuberculeuses ou de femmes gravides.

Cependant, les extraits urinaires de sujets normaux donnaient également une fibrinolyse accrue pour 30% des cas.

On voit donc que les résultats de tous ces essais sont contradictoires, et que le contrôle de l'*activité fibrinolytique des urines ne peut pas encore*, en l'état actuel des choses, *servir au diagnostic du cancer*. C'est pourquoi nous avons voulu, par nos essais, apporter une modeste contribution à cette étude si passionnante.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V

ÉTUDE DU POUVOIR LYTIQUE D'EXTRAITS URINAIRES PAR LE THROMBOGRAPHE DE HIRTZ

HIRTZ a construit un appareil, *appelé* « *Thrombographe* », et destiné à la mesure clinique du temps de coagulation près du lit du malade. Il

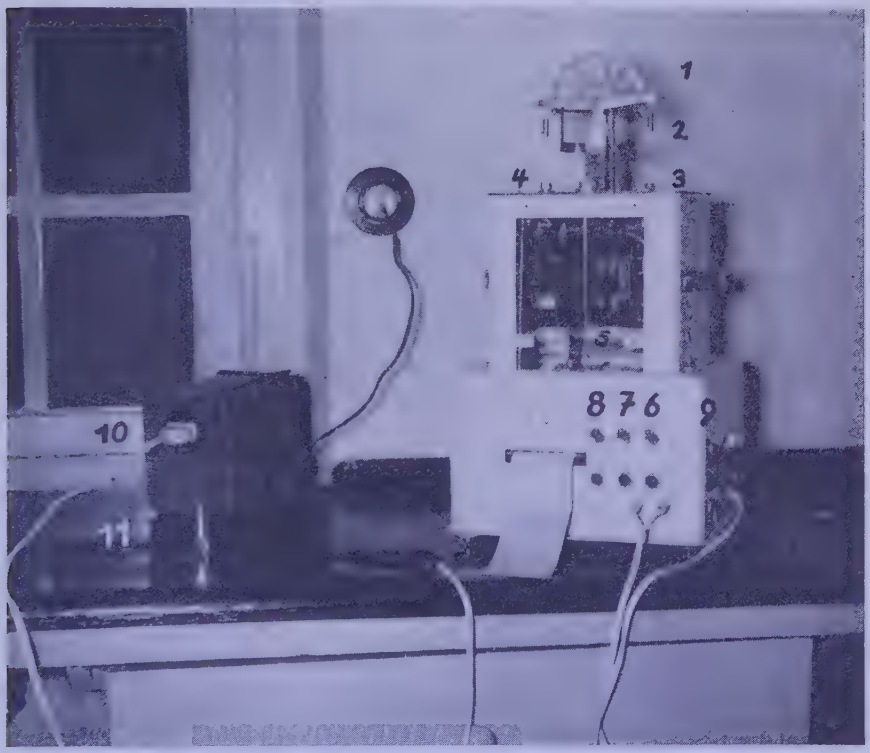


Fig. N° 2 — Thrombographe de HIRTZ

1. Balance de précision ; 2. Plongeurs ; 3. Cuvette témoin ; 4. Cuvette pour le sang ; 5. Enregistreur automatique ; 6. Commutateur du thermostat de prélèvement ; 7. Commutateur du thermostat de la cuvette d'expérience ; 8. Commutateur de l'enregistreur automatique ; 9. Commutateur d'éclairage ; 10. Transformateur ; 11. Manipulateur avec thermostat pour le prélèvement de sang du malade.

nous a semblé intéressant d'étudier *le pouvoir lytique des extraits urinaires de sujets sains et cancéreux* au moyen de cet appareil, qui doit enregistrer directement le phénomène.

Nous reproduisons tout d'abord dans les figures une photographie de l'appareil, puis ci-dessous un schéma du système de balance du Thrombographe.

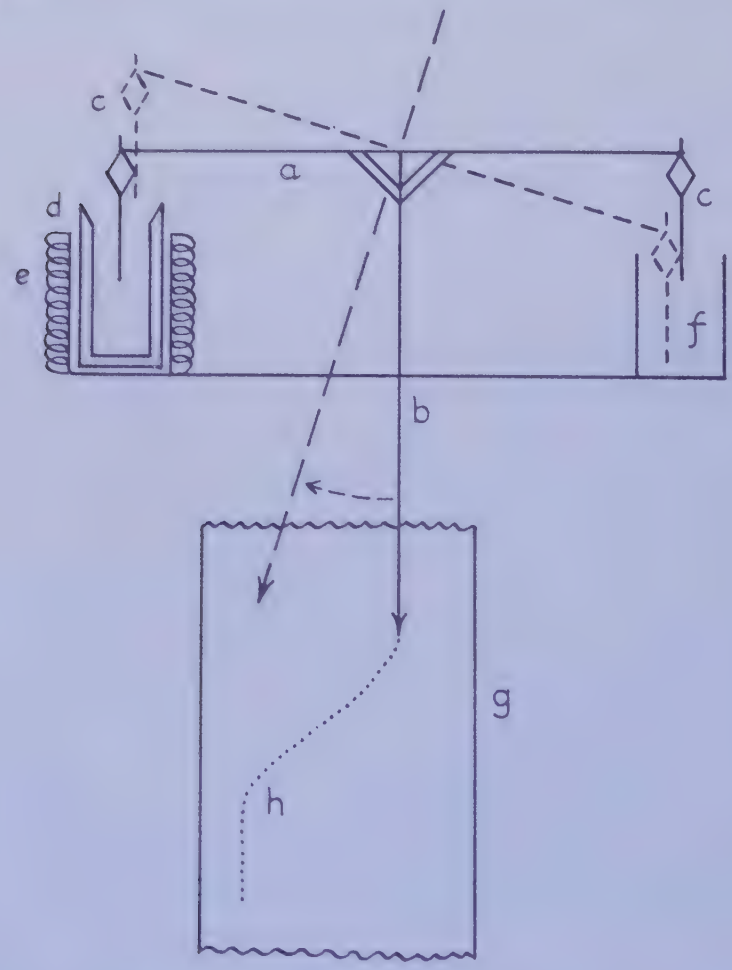


Fig. N° 3 — Schéma du système de balance.

a = bras; b = fléau; c = plongeurs; d = thermostat; e = cuve; f = courbe enregistrée; g = papier enregistreur.

Principe:

Le principe du *Thrombographe* repose sur l'enregistrement du degré de viscosité du gel fibrineux se formant au cours du processus de coagulation dans le sang à examiner.

L'appareil est muni d'une balance très sensible à point de gravité bas, qui réagit en rapport direct avec les effets frénateurs (rigidité croissante) du gel fibrineux en formation. La balance porte à ses deux bras horizontaux deux plongeurs cylindriques en acier poli V2A, mesurant 2,5 cm × 0,1 cm. L'un des plongeurs *(expérience)* trempe dans une cuve cylindrique en acier poli prévue pour la réception du sang à étudier. Cette cuve est munie d'un thermostat permettant un chauffage stable à 37°. L'autre plongeur tient la balance en équilibre : il trempe dans une solution de même densité que le sang et qui est contenu dans la cuve témoin. Les deux cuves sont en mouvement vertical périodique; chaque période correspond à 12 secondes pour parcourir un espace libre de 1,5 cm de haut en bas et vice-versa. Dès que la rigidité croissante du sang en coagulation se répercute sur le plongeur d'expérience, la balance oscille et transmet le degré de rigidité sur une bande de papier en mouvement synchronisé. L'enregistrement des oscillations de la balance en fonction du temps continue automatiquement et est directement lisible sur une bande de papier à déroulement régulier. Chaque oscillation périodique correspond à 12 secondes et est marquée par un point noir. Chaque cinquième période, égale à une minute, est notée par un point rouge. Cette technique permet donc de suivre directement le déroulement du phénomène de coagulation, et inversement du phénomène de fibrinolyse.

Nous ne revenons pas sur le mode d'emploi du *Thrombographe*, qui a été exposé dans tous les détails par Frey (66). A titre documentaire, nous reproduisons *la courbe de coagulation d'un sang de lapin normal* (temps de coagulation : 14 minutes 30).

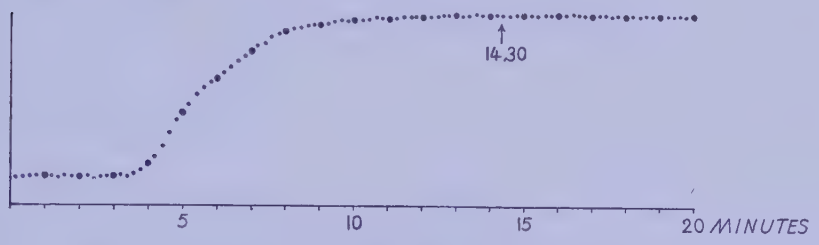


Fig. N° 4 — Courbe de coagulation d'un sang de lapin normal.

Interprétation :

Le tracé commence à gauche avec une phase initiale horizontale, puisque la viscosité du sang fraîchement prélevé correspond encore à celle de la solution témoin. Après environ 5 minutes, le taux de Thrombine libérée est suffisant pour activer la formation de la fibrine. La viscosité du sang en expérience augmente par conséquent, et on note une montée rapide de la courbe. Le début de cette montée et son importance diffèrent d'un individu à l'autre. Il est évident que dans

nos contrôles du phénomène de lyse, nous n'emploierons pas le sang total, mais un système de coagulation artificiel, d'un emploi simple, fidèle et rapide.

Composition du système de coagulation artificiel :

Parmi les différents systèmes de coagulation artificiels mis au point pour *le dosage de l'activité fibrinolytique*, nous avons retenu celui utilisé par FREY :

Sérum humain inactivé	0,05 ml
Soluté physiologique	0,10 ml
Solution de Fibrinogène	0,35 ml
Solution de Thrombine	0,05 ml

Pour les expériences, nous ajoutons à ce système une *Fibrinolysine*, purifiée à taux connu et stable, ou l'extrait lytique précipité d'urines de sujets sains ou cancéreux.

Sérum humain :

Il doit être fraîchement prélevé et débarrassé des anticorps non spécifiques par chauffage à 56° pendant 30 minutes. Il apporte les ions Calcium indispensables à la coagulation.

Soluté physiologique :

Il n'intervient pas dans la réaction elle-même, il sert uniquement à maintenir la constante quantitative du système de coagulation. Avant chaque essai, nous contrôlons le système de coagulation en remplaçant *la Fibrinolysine-substance ou les extraits lytiques* par le soluté physiologique. La partie supérieure de la courbe, correspondant à la phase solide, doit rester constante. Ce test permet d'éliminer les phénomènes d'autolyse du caillot.

Fibrinogène :

C'est le *Fibrinogène Behring (Marburg)* qui nous a donné le plus de satisfaction parmi les différents produits que nous avons examinés. Ce *Fibrinogène de bœuf* étant totalement purifié, il ne risque pas d'introduire dans le système de coagulation un supplément de *Profibrinolysine* qui fausserait les résultats.

Nous avons utilisé une solution à 0.6 g %, le gel de fibrine ainsi obtenu est assez consistant pour les expériences au moyen du Thrombographe.

Thrombine :

Nous avons employé la *Thrombase Roussel*. L'activité optimale est

obtenue en dissolvant 20 mg de Thrombase dans 6 ml de soluté physiologique.

Comme l'introduction de la Thrombine dans le système déclenche la réaction de coagulation, l'enregistrement de celle-ci doit commencer à ce moment-là.

Fibrinolysine :

Nous avons eu recours à une Fibrinolysine standard préparée par la *Ortho-Research-Foundation à Raritan (New-Jersey)*. Nous avions à notre disposition les lots N^{os} PP-509 à PP-515. Nous préparons une solution standard à la concentration de 100 mg dans 1 ml de soluté physiologique, la dissolution est presque instantanée. Cette solution se conserve un certain temps au réfrigérateur.

Protocole expérimental:

Nous décrivons ici le protocole expérimental pour le système de coagulation artificiel; nous emploierons tout au long de nos travaux les mêmes solutions, aux mêmes concentrations et dans le même ordre d'introduction. Nous préparons les réactifs suivants :

Solution de Fibrinogène :

Nous introduisons 60 mg de Fibrinogène dans 10 ml de soluté physiologique. Le Fibrinogène gonfle, puis se dissout, à condition d'ajouter le solvant goutte à goutte et à la température d'environ 37°. La solution doit être absolument limpide.

Solution de Thrombine :

On dissout 20 mg de Thrombase dans 6 ml de soluté physiologique. La dissolution est instantanée et la solution doit être préparée extemporanément.

Solutions de Fibrinolysine :

Nous préparons une gamme de dilutions à concentrations décroissantes à partir de la solution standard, de façon à obtenir des solutions contenant de 1,25 mg à 10 mg pour 0,1 ml, comme il ressort du protocole expérimental que nous donnerons ci-après.

On chauffe le Thrombographe, puis on introduit dans la cuve les différents réactifs du système de coagulation artificiel dans l'ordre indiqué ci-dessus. Cette réaction nous donne le tracé suivant :

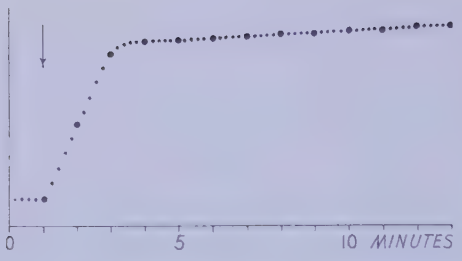


Fig. N° 5 — Courbe de coagulation du système de coagulation artificiel. La flèche indique l'introduction de la solution de Thrombine.

Interprétation :

On note que l'introduction de la Thrombine occasionne une coagulation presque immédiate du système de coagulation artificiel, ce qui se manifeste par une montée brusque de la courbe. La rigidité maximale du coagulum est obtenue après 120 à 150 secondes. Ce fait a son importance pour l'interprétation des essais de lyse au moyen de la *Fibrinolysine* ou de l'*extrait urinaire lytique*, puisque la présence de ce dernier, comme nous le verrons plus loin, ne freine pas le processus de la coagulation, et ceci même à de hautes concentrations. Il n'y a pas non plus de lyse partielle éventuelle, le processus étant terminé après environ 2 minutes, alors que la Fibrinolysine, même à haute concentration, nécessite quelques minutes pour faire apparaître l'effet lytique.

A titre d'exemple nous reproduisons ci-dessous la courbe obtenue en introduisant dans le système de coagulation artificiel 7,5 mg ml de Fibrinolysine-substance :

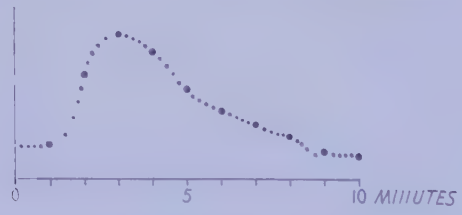


Fig. N° 6 — Action de 7.5 mg ml de Fibrinolysine sur le système de coagulation artificiel.

Interprétation :

La chute de la courbe indique le début de la lyse et correspond à une diminution de la rigidité du coagulum. Le temps de lyse est compris entre le moment de l'introduction de la Thrombine et celui du retour à la viscosité initiale.

On pourrait définir ce temps en prenant en considération seulement la durée de la *viscosité maximale* jusqu'au retour à la viscosité initiale. Mais

ceci est impossible, par suite des propriétés fibrinolytiques du ferment que nous étudions ; celui-ci débute son activité à partir de la première minute environ où il a été mis en présence du substrat réactionnel. On voit par conséquent l'intérêt pratique d'une manipulation rapide. D'autre part, en considérant les deux graphiques ci-dessus il nous a semblé qu'il existe un rapport quantitatif entre la concentration de la Fibrinolysine et le temps de lyse.

Étude du pouvoir lytique de doses décroissantes de Fibrinolysine :

Nous avons jugé nécessaire d'effectuer une série de contrôles préliminaires à l'aide de notre système de coagulation artificiel et de doses progressivement décroissantes de *Fibrinolysine*, allant de 40 mg/ml à 0,625 mg ml. La solution de *Fibrinolysine* est toujours introduite sous le même volume, quelle que soit la concentration, c'est-à-dire 0,1 ml, et l'enregistreur est déclenché aussitôt que le système est complet.

Nous rapportons dans le tableau suivant les temps de lyse observés pour les différentes concentrations de Fibrinolysine :

TABLEAU N° 3

Taux de Fibrinolysine en mg/ml	Temps de lyse en minutes
0,625	45′
1.25	20′
2,50	15′
2,75	14′
3,75	11′
5,00	9′
10,00	6′
15,00	4′40″
20,00	4′
40,00	3′
50,00 (témoin)	pas de coagulum

A titre d'exemple, nous rapportons quelques-unes des courbes enregistrées au cours de ces essais ci-après.

En reportant ces valeurs sur une courbe où nous inscrivons en ordonnée les concentrations en Fibrinolysine et en abscisse le temps de lyse en minutes, nous obtenons une courbe-étalon en hyperbole, qui nous permettra ultérieurement d'apprécier des concentrations inconnues en Fibrinolysine.

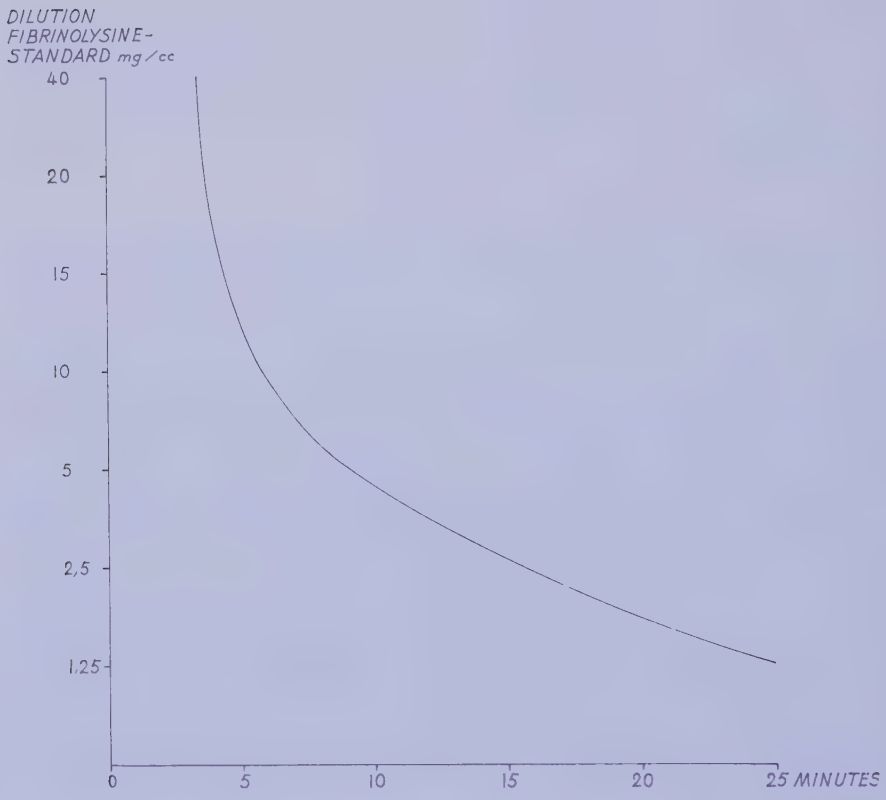


Fig. N° 7 — Exemples du rapport entre le taux de Fibrinolysine et le temps de lyse du coagulum standard.

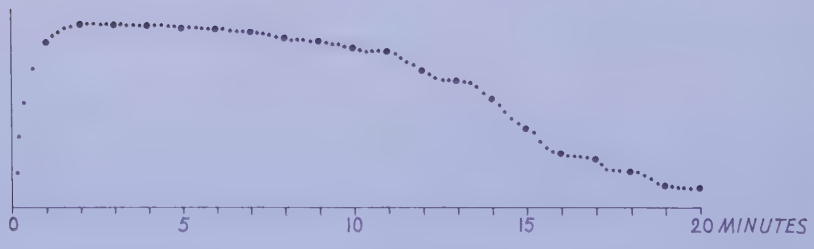


Fig. N° 7 a

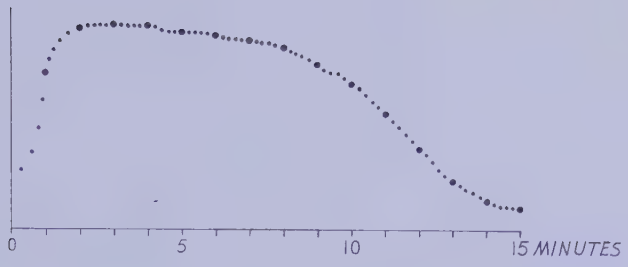


Fig. N° 7 b

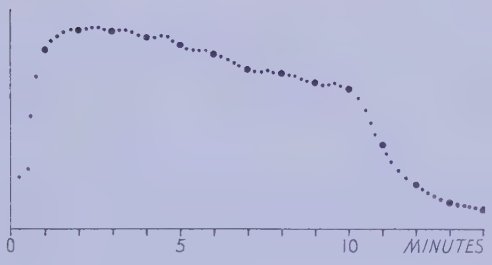


Fig. N° 7 c

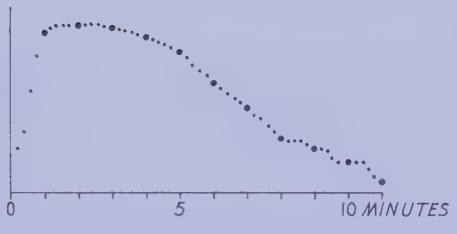


Fig. N° 7 d

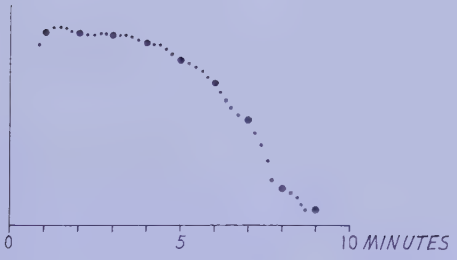


Fig. N° 7 e

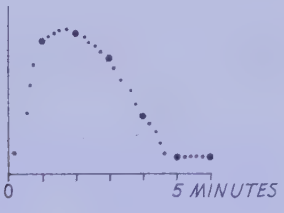


Fig. N° 7 f

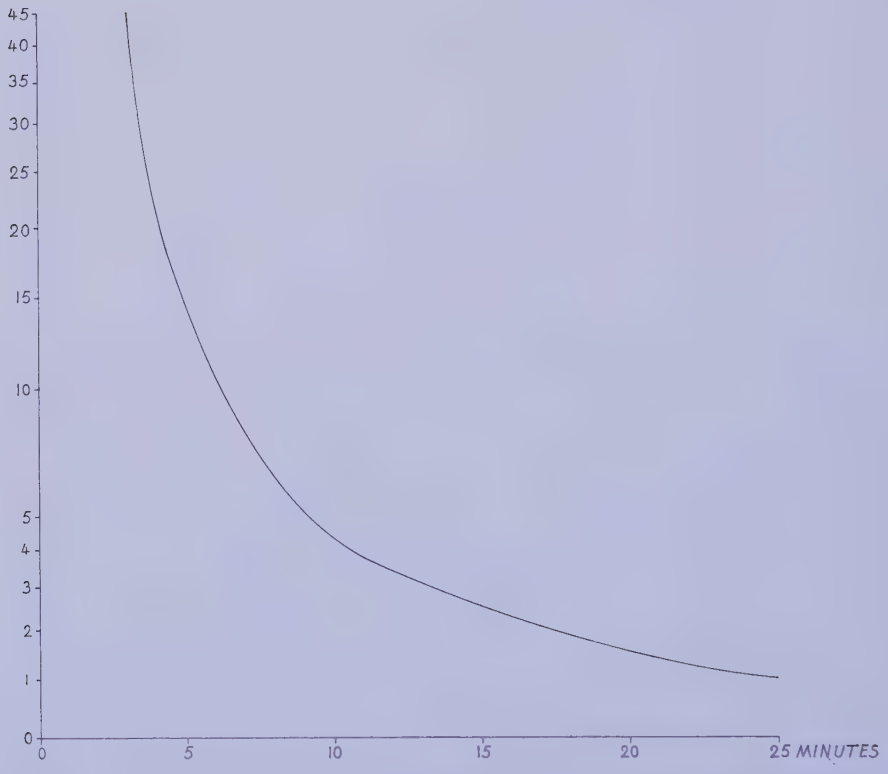


Fig. N° 8 — Courbe-étalon de lyse du système de coagulation artificiel en fonction de la concentration en Fibrinolysine.

Pour des concentrations supérieures à 40 mg/ml, la lyse est très rapide et dans certains cas, le coagulum n'a pas le temps de se former; dans ces cas, notre raisonnement antérieur concernant l'intervention tardive de la Fibrinolysine, se manifestant 5 à 6 minutes après le processus de coagulation, ne peut plus s'appliquer.

Un taux en Fibrinolysine inférieur à 1,25 mg/ml n'amène la lyse qu'après un temps dépassant 20 minutes. Ces deux concentrations représentent les limites au-delà desquelles l'expérience ne présente plus d'intérêt.

Nous sommes donc en présence d'une méthode précise et élégante pour l'appréciation du phénomène lytique, permettant le dosage de la Fibrinolysine sous la seule réserve que son taux ne soit ni trop faible, ni trop élevé.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DU POUVOIR LYTIQUE D'EXTRAITS URINAIRES D'ORIGINE CANCÉREUSE PAR LE THROMBOGRAPHE DE HIRTZ

Nos premières recherches ont eu pour but d'isoler et de caractériser l'enzyme fibrinolytique déjà trouvé par NITSCHE et par ARON dans les urines de cancéreux, puis d'en étudier le pouvoir lytique à l'aide du Thrombographe.

Au cours de nos premiers essais, nous avons profité des observations de GREGO et de SALADIN en ce qui concerne les techniques d'extraction, sans perdre de vue que notre méthode de mesure exige une certaine concentration du ferment lytique, permettant de déclencher une réaction de lyse appréciable en un temps relativement restreint.

Isolement d'un enzyme fibrinolytique à partir d'urines de cancéreux :

Les urines de cancéreux sont d'abord examinées quant à la présence d'albumine et quant à la concentration ionique, ce qui devait nous permettre d'éliminer dès l'abord un certain nombre de facteurs qui auraient pu gêner la réaction. Cette première sélection faite, nous avons procédé de la façon suivante :

Nous avons employé 50 ml des premières urines de la journée, que nous avons filtrées et acidifiées à pH 2,8 à 3,5 à l'aide d'une solution d'acide lactique à 5 %. On additionne ensuite de 50 ml d'acétone, on agite soigneusement, puis on laisse déposer pendant une heure à la température du laboratoire. On centrifuge pendant 30 minutes à 3 000 t/mn. Le précipité obtenu est lavé à deux reprises avec de l'acétone après décantation du liquide surnageant.

Finalement, on retourne le tube de centrifugation sur une feuille de papier-filtre et on laisse égoutter ainsi pendant 15 minutes. On enlève les dernières traces d'acétone en essuyant les bords du tube à l'aide de papier-filtre.

Le précipité est ensuite déshydraté sous anhydride phosphorique dans le vide pendant 12 à 24 heures. On obtient des pellicules jaunes brunâtres qui se dissolvent dans le soluté physiologique.

Après les avoir pesées, nous les avons introduites dans des ampoules de verre que nous avons soudées pour les conserver à la glacière.

Pour l'expérience, la totalité de l'extrait est mis en solution dans 5 ml de soluté physiologique; la suspension est centrifugée et décantée, et pour nos premiers essais, nous nous sommes servis de la phase liquide.

Chaque série de contrôles du phénomène de lyse par les extraits urinaires doit être précédée d'un test du système de coagulation artificiel, dont la composition est toujours identique. La première phase de la courbe thrombographique correspondant à la phase solide du caillot ne doit présenter aucun fléchissement et doit évoluer selon une droite, sinon les réactifs sont à vérifier. Nous insistons également sur la nécessité de tenir la cuve rigoureusement propre : elle doit être nettoyée et siliconée après chaque essai.

Nos premiers essais avec des urines cancéreuses nous ont donné des réactions de fibrinolyse très lentes, dépassant toutes 20 minutes. Pensant que notre extrait n'était pas assez concentré, et l'intérêt de notre méthode résidant dans sa rapidité, nous avons été amené à modifier la technique d'extraction de l'enzyme fibrinolytique, car la faiblesse d'action de notre extrait pouvait, à notre avis, provenir d'une extraction imparfaite, à moins que le résidu insoluble ne contienne une partie de *Fibrinolysine* non libre ou une partie de *proferment* non activé, et qu'il retienne ainsi une fraction du pouvoir lytique des urines.

Nous avons tout d'abord tenté d'améliorer notre technique d'extraction. A cet effet, 50 ml d'urine de la première miction sont ajustés au pH de 6,8 à 7,2 puis filtrés. On précipite à l'aide d'un mélange à parties égales d'alcool méthylique et d'acétone. Nous avons obtenu une précipitation optimale par addition de 5 volumes du mélange alcool-acétone pour un volume d'urine. On laisse reposer 10 minutes et on centrifuge 30 minutes à 2 500 t/mn ; contrairement à la technique de Saladin, nous ne procédons qu'à une seule extraction. Les bords du tube de centrifugation sont lavés à l'alcool-acétone, on laisse égoutter sur papier comme précédemment, on déshydrate dans le vide sous anhydride phosphorique, puis on dissout dans 5 ml de soluté physiologique en deux étapes :

Le précipité provenant de 50 ml d'urine est repris par 1,0 ml de soluté physiologique, on sépare par centrifugation; le culot est encore repris par 1,0 ml de soluté physiologique; on réunit les deux filtrats qui constituent notre système fibrinolytique.

Nous avons ensuite introduit 0,1 ml de ce système fibrinolytique dans notre mélange coagulant standard, et dans ces conditions, le temps de lyse moyen des extraits urinaires d'origine cancéreuse était de 15 minutes, avec un minimum de 13 minutes et un maximum de 18 minutes.

Le problème de l'extraction nous paraissant ainsi résolu, nous nous sommes penché sur celui de l'activité lytique éventuelle du *résidu insoluble.*

Nous avons mis ce résidu en suspension dans du soluté physiologique et introduit dans le système coagulant pour contrôler la lyse au moyen

du Thrombographe. Au bout de 60 minutes, aucun phénomène de lyse ne s'étant manifesté, nous avons tenu à contrôler cette expérience au moyen de la méthode des tubes à hémolyse décrite par SALADIN, dont le protocole expérimental se dégage du tableau suivant :

TABLEAU N° 4

Réactifs en ml	Tubes N°		
	1	2	3 (témoin)
Suspension de résidu insoluble	0,2	0,4	0,0
Soluté physiologique	0,2	0,0	0,4
Solution de Fibrinogène	0,5	0,5	0,5
Solution de Thrombine	0,2	0,2	0,2

Ces tubes à hémolyse sont disposés au bain-marie à 37°; au bout de 2 à 3 minutes le contenu des trois tubes était gélifié. A partir de ce moment, nous surveillons les tubes pour constater la liquéfaction du système de coagulation artificiel qui est survenue après 1 heure pour le tube N° 2, au bout de 2 heures pour le tube N° 1, alors que le contenu du tube témoin restait coagulé.

On peut déduire de cette expérience que dans l'urine que nous avons examinée, la *Fibrinolysine* existe non seulement sous forme soluble, mais également sous forme combinée plus ou moins soluble ou comme *Profibrinolysine*. Malheureusement nos essais ne nous permettent pas de préjuger du type de la réaction. Sommes-nous en présence d'une autocatalyse, ou d'une réaction de catalyse faisant appel à un activateur, l'*Urokinase ?* S'agit-il d'un Antiferment *(protéinase de défense)* d'ABDERHALDEN? On sait que d'après cet auteur, l'activateur urinaire serait différent de celui des tissus, ces derniers étant toujours liés à des protéines structurales. Nos travaux nous font plutôt pencher vers la thèse de l'*Urokinase*. Cette *kinase*, extraite de l'urine par fractionnement acétonique, serait aussi active que la *Streptokinase*. Insoluble à un pH supérieur à 5,0 (ce qui explique sa présence dans notre résidu de précipitation), elle présente une certaine stabilité si on la conserve à l'abri de l'humidité.

De ces expériences préliminaires découle un problème important : *Quelle est la valeur quantitative de ce proferment ; dans quelle mesure intervient-il dans le phénomène de fibrinolyse ; devons-nous tenir compte du proferment dans nos recherches, ou non ?*

Essais d'activation de la Profibrinolysine :

Les nombreux travaux publiés dans la littérature spécialisée nous ont appris que les meilleurs résultats dans ce domaine sont obtenus à l'aide du *Chloroforme* et de la *Streptokinase*.

Activation par le Chloroforme :

En nous référant aux travaux de SALADIN, nous avons essayé d'activer l'*urine totale*, et non l'extrait lytique, ce qui nous semblait tout à fait logique, étant donné la solubilité de tous les facteurs à pH = 6,8 — 7,2.

Nous partons d'une urine, dont nous prélevons deux fractions de 50 ml:

— le premier échantillon reste tel quel, et sert de témoin,

— le second est mis en contact avec 5 ml de Chloroforme pendant 60 minutes à la température du laboratoire, en agitant de temps en temps.

On procède ensuite à l'extraction des deux échantillons selon la technique habituelle. Les précipités obtenus sont dissous dans deux fois 0,5 ml de soluté physiologique, puis incorporés dans notre système de coagulation artificiel et le temps de lyse est contrôlé par le *Thrombographe*. Les deux tracés obtenus montrent que le temps de lyse de l'échantillon activé par le Chloroforme est inférieur de 25 % à celui de l'échantillon non activé.

Nous avons fait un nouvel essai d'activation par le Chloroforme, en laissant en contact pendant 20 heures à une température de 7° : la réduction du temps de lyse par rapport au témoin n'a pas dépassé 30 %.

Activation par la Streptokinase :

Nous avons préparé une solution de *Streptokinase* titrant 10 000 unités par centimètre cube. D'après nos essais, l'addition de 5 000 unités de *Streptokinase* pour 1 000 ml d'urine est suffisante pour obtenir une activation optimale, et ceci comme pour le Chloroforme, par contact d'une heure à la température du laboratoire.

Les résultats obtenus par la *Streptokinase* sont légèrement supérieurs à ceux enregistrés pour le *Chloroforme*. Nous reproduisons ci-dessous les courbes enregistrées au cours de ces essais :

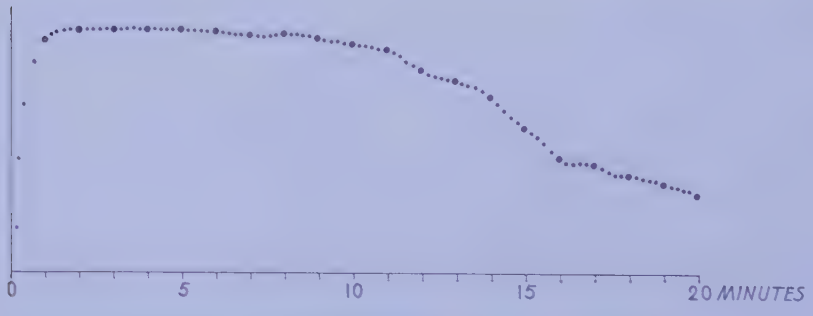


Fig. N° 9

Courbe A : sans activation = TL = 20';

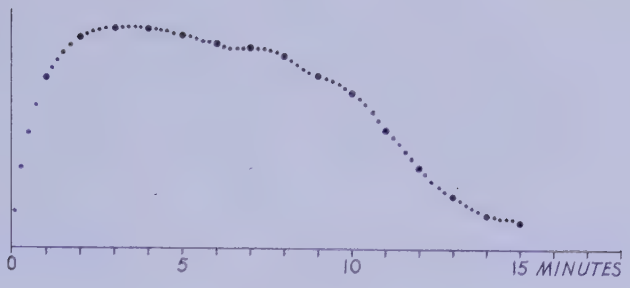


Fig. N° 9 a

Courbe B : après activation par la Streptokinase : TL = 15'.

Il ressort de ces expériences que le meilleur activateur est bien la *Streptokinase*, dont l'addition doit se faire directement dans les urines fraîches et non dans la suspension de l'extrait précipité. Nos essais nous ont d'autre part montré que le *Chloroforme* perturbe la formation du gel fibrineux, ce qui se traduit par une courbe de lyse peu régulière. Nous avons également constaté que l'activité de la *Fibrinolysine* peut augmenter spontanément, sans l'aide d'un activateur; les maxima d'activité sont obtenus après un séjour de 45 heures à 7°, ce qui semble bien confirmer l'existence d'une *Fibrinokinase* ou *Urokinase*.

Nos expériences montrent que l'activation lytique de l'urine exige certaines conditions optimales. L'optimum de température se situe entre 20° et 37° et à pH = 7,2. L'activité lytique diminue au-delà de 50°, elle est complètement inhibée à 100°. Cette perte d'activité semble surtout imputable à la *Fibrinokinase* ou *Urokinase*, beaucoup plus labile que la Fibrinolysine. Nous avons résumé ces constatations dans le graphique N° 10.

Contrôle du pouvoir fibrinolytique des urines saines:

Afin de compléter ces études préliminaires, nous avons tenu à contrôler les propriétés fibrinolytiques des *urines saines*.

Nous avons procédé à l'extraction de 15 urines provenant de sujets sains. Selon la technique habituelle, et après activation au moyen de la *Streptokinase*, nous n'avons obtenu qu'un seul temps de lyse inférieur à 20 minutes, alors que la moyenne générale était de 50 à 60 minutes, et que pour certains échantillons nous n'avons pas obtenu de lyse du tout.

Nous avons également contrôlé 10 urines de *tuberculeux*, parmi lesquelles un seul échantillon nous a donné un temps de lyse inférieur à 20 minutes.

Par contre, sur 10 urines de *femmes enceintes*, 3 ont un temps de lyse tombant dans les limites obtenues pour les urines de sujets cancéreux, fait pouvant constituer un fort pourcentage de résultats faussement positifs par notre méthode.

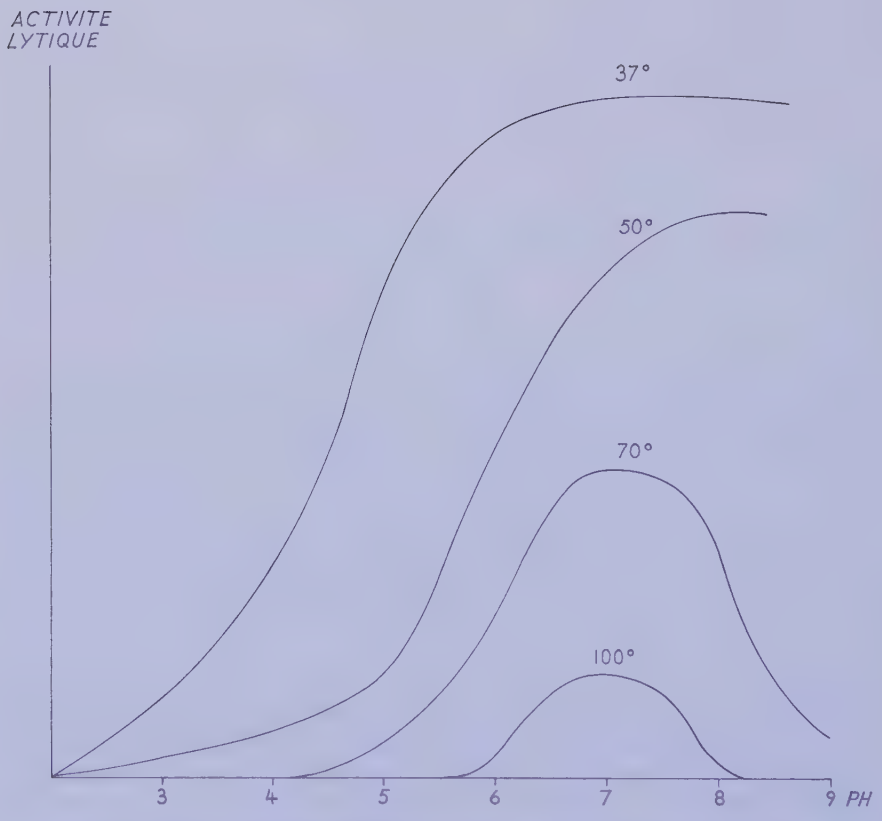


Fig. N° 10 — Variation du phénomène de lyse de l'extrait urinaire en fonction du pH et de la température.

Étude quantitative du pouvoir lytique des urines de cancéreux :

En nous référant aux différentes dilutions de *Fibrinolysine-substance* et aux temps de lyse proportionnels à cette concentration, nous avons essayé de *définir la quantité de Fibrinolysine d'un extrait urinaire* par rapport à cet étalonnage. Nous procédons toujours de la même façon :

Le précipité alcoolo-acétonique de 50 ml d'*urine pathologique* repris dans 1 ml de soluté physiologique, est dilué à 1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16, puis introduit dans notre système de coagulation artificiel à raison de 0,1 ml. Le temps de lyse est strictement proportionnel à la concentration en extrait, et nous avons noté une concordance exacte avec notre système de référence. Nous avons reproduit cette étude quantitative à 10 reprises, et tous les extraits se sont comportés de la même façon :

TABLEAU N° 5

Temps de lyse en fonction de différentes dilutions de la Fibrinolysine-standard.

Dilution de la Fibrinolysine-standard	Temps de lyse en minutes
1/1	12′
1/2	18′
1/4	24′
1/8	32′
1/16	< 60′

TABLEAU N° 6

Temps de lyse en fonction de la dilution de l'extrait urinaire.

Échantillon N°	Dilution				
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
	Temps de lyse en minutes				
1	18	23	30	40	< 60
2	12	20	29	37	»
3	8	16	18	34	»
4	9	17	30	36	»
5	15	29	40	50	»
6	13	25	35	43	»
7	14	29	35	46	»
8	17	30	40	50	»
9	19	31	39	49	»
10	11	25	40	55	»
Moyenne :	13′30″	24′30″	33′36″	43′	< 60

Si nous nous reportons à notre courbe d'étalonnage, le temps de lyse nous étant donné par l'expérience, l'ordonnée correspondante nous indique la concentration en Fibrinolysine ; en multipliant ce chiffre par 20, et éventuellement par le dénominateur de dilution, nous obtenons la concentration pour 1 000 ml d'urine.

Le seul inconvénient de cette technique réside dans le fait que nous ne pouvons apprécier les quantités de Fibrinolysine contenues dans les dilutions d'extraits urinaires très poussées. Il nous est par conséquent difficile d'établir avec précision la limite de positivité entre les urines saines et pathologiques.

C'est pour résoudre ce problème que nous avons jugé indispensable de procéder à des expériences au moyen d'un grand nombre d'échantillons d'*urines pathologiques* pour essayer de fixer une limite arbitraire du temps de lyse, et par conséquence directe, de la concentration moyenne en Fibrinolysine par litre d'urine chez les cancéreux.

Étude qualitative et quantitative portant sur 84 échantillons d'urines cancéreuses:

Nous avons décrit plus haut les conditions de température, d'extraction, de pH et d'activation. Rappelons ici les points les plus importants, que nous avons scrupuleusement respectés dans l'étude de ces 84 échantillons.

La solution témoin de Fibrinolysine :

Pour obtenir la solution-mère, on dissout 100 mg de Fibrinolysine-substance dans 1 ml de soluté physiologique. A partir de cette solution-mère on prépare des dilutions comme nous l'avons indiqué antérieurement; celles-ci doivent être testées avant chaque expérience et les temps de lyse doivent être toujours identiques (± 1'30").

La solution de Thrombine :

Nous l'avons toujours préparée à partir de *Thrombase Roussel*, à raison de 20 mg pour 6 ml de soluté physiologique. La solution est à préparer extemporanément et à utiliser dans les 4 heures.

Le Fibrinogène :

Nous insistons particulièrement sur l'emploi du Fibrinogène Behring, qui a une concentration de 0,6 % et forme un gel consistant répondant aux exigences de la thrombographie. Nous avons remarqué qu'il est important que le *Fibrinogène* forme un gel parfait et régulier au moment de l'addition de la solution de *Thrombine dans la cuve du Thrombographe*, condition essentielle pour obtenir des résultats de lyse réguliers et reproductibles. Le gel de fibrine doit correspondre à des propriétés physiques telles que le va-et-vient du plongeur ne provoque pas d'exsudat d'eau.

Le *Fibrinogène Behring* se présente en tube dosé à 60 mg. Il est important de respecter le protocole de mise en solution: Dans le tube d'origine, ajouter 4 ml de soluté physiologique; immerger les particules surnageantes à l'aide d'un agitateur, disposer à 37° pendant quelques minutes, afin qu'il se produise une sorte d'autolyse; lorsque la solution est limpide, ajouter encore 6 ml de soluté physiologique. Le *Fibrinogène* en solution se conserve 12 heures à la température du laboratoire; on peut le conserver pendant 48 heures à la glacière sous une goutte de toluène.

La Streptokinase :

Nous avons préparé la solution de *Streptokinase* servant à l'activation à partir du mélange *Streptokinase-Streptodornase fabriqué par Lederlé sous le nom de « Varidase »*. Le flacon original contient 20 000 unités que nous dissolvons dans 2 ml de soluté physiologique. La concentration optimale étant de 5 000 unités/litre, nous employons 0,025 ml de notre solution pour 50 ml d'urine. Nous contrôlons le réactif avant chaque série d'expériences, et au cours de ce test, le coagulum doit rester constant de 10 à 20 minutes. Au cours de l'extraction de la fibrinolysine contenue dans les urines, il est important que le pH soit maintenu entre 6,8 et 7,2, ce qui est obtenu par addition de NaOH N/20 ou d'acide lactique à 5 %, selon le cas.

Dans cette série d'expériences, nous n'étudions que *l'activité lytique de l'urine de cancéreux*, et non le dosage d'antiferments dans le sérum. Dans le chapitre suivant, nous étudierons l'influence du sérum intervenant dans la réaction elle-même.

Dans le tableau suivant, nous rapportons les résultats obtenus au cours de ces recherches :

TABLEAU N° 7

Nature du cancer	Nombre de cas	Temps extrêmes de lyse	Moyenne des temps de lyse
Poumons et bronches	8	7'—17'	12'
Col et vagin	22	9'—18'	13'30''
Prostate	9	6'—12'	9'
Ovaires	3	10'—23'	11'30''
Langue	15	13'—20'	16'30''
Testicules	3	8'—10'	9'
Seins	6	15'—23'	19'
Thyroïde	1	16'	16'
Vessie	2	9'—15'	12'
Rectum	15	8'—17'	12'30''
Total des cas	84		

Interprétation :

Nous avons dès l'abord éliminé de cette série les cas donnant un résultat négatif, pour ne pas fausser la moyenne des temps de lyse. Sur les 84 cas restants, nous en avons trouvé 8 dont le temps de lyse dépassait 20 minutes. A la lumière de ces données, nous considérons comme positives toutes les réactions dont le temps de lyse ne dépasse pas 20 minutes.

Dans le tableau suivant nous calculons, en nous reportant à la courbe étalon, la teneur moyenne en *Fibrinolysine libre* par rapport au temps de lyse moyen obtenu pour les différentes sortes de cancers :

TABLEAU N° 8

Nature du cancer	Temps de lyse moyen en minutes	Taux moyen de Fibrinolysine libre en mg/litre
Poumons et bronches	12′	700
Col et vagin	13′30″	600
Prostate	9′	1 000
Ovaires	11′30″	800
Langue	16′30″	500
Testicules	9′	1 000
Seins	19′	350
Thyroïde	16′	450
Vessie	12′	700
Rectum	12′30″	750

Conclusion :

En ce qui concerne l'activité fibrinolytique urinaire, nos travaux confirment les résultats obtenus antérieurement par NITSCHE, GREGO et SALADIN.

La plupart des extraits d'urines de cancéreux donnent une lyse plus nette et plus rapide que les extraits provenant d'urines de sujets sains ou atteints d'autres maladies que le cancer. Cependant, nous avons trouvé 2 résultats faussement positifs et 8 résultats faussement négatifs (soit 9,52 %), parmi lesquels : 2 cancers du sein, 3 cancers de la langue, 1 cancer du vagin et 2 des poumons et des bronches. Malgré cela, nous croyons pouvoir affirmer que cette réaction donne des résultats corrects dans un pourcentage satisfaisant. Les meilleurs résultats sont obtenus dans les cas de cancers uro-génitaux, du rectum et de la prostate. Pour cette dernière affection, la méthode donne 100 % de résultats corrects, ce qui confirme les nombreux travaux effectués dans ce domaine.

Ayant eu l'occasion de travailler uniquement sur du matériel provenant de cas de cancers cliniquement diagnostiqués, nous sommes conscient de ne pouvoir affirmer la valeur de notre technique comme moyen d'investigation précoce, dans le stade actuel de nos travaux. Cependant, la mise au point de cette méthode rapide et relativement simple pourrait être le point de départ de recherches sur une plus grande échelle, et avec des urines de plus en plus indéfinies au point de vue clinique.

En effet, cette nouvelle technique d'étude du pouvoir fibrinolytique des urines à l'aide du Thrombographe présente de notables améliorations sur les méthodes précédentes, en particulier :

— Par une plus forte concentration de l'extrait et grâce à l'emploi de notre système de coagulation artificiel, la réaction est plus rapide et plus nette.

— La réaction ne porte que sur les variations physiques (thrombo-élastiques) du coagulum, évitant ainsi les interférences cliniques du Fibrinogène qui faussent souvent *les réactions colorimétriques* (réaction du Biuret ou par les réactifs de Folin).

— La lecture et l'interprétation du résultat est possible à tout moment, la lyse étant progressivement enregistrée et pouvant être contrôlée en cours de déroulement.

— L'établissement d'une courbe d'étalonnage à l'aide d'une Fibrinolysine-standard permet une interprétation quantitative des résultats obtenus.

Avant de terminer ce chapitre, nous tenons à rapporter dans un tableau récapitulatif les résultats obtenus au cours de ces recherches préliminaires.

TABLEAU N° 9

Nature du cancer	Nombre de cas	Réactions positives	Pourcentage	Réactions négatives	Pourcentage
Poumons et bronches	8	6	75 %	2	25 %
Col et vagin	22	21	95 %	1	5 %
Prostate	9	9	100 %	0	—
Ovaires	3	3	100 %	0	—
Langue	15	12	80 %	3	20 %
Testicules	3	3	100 %	0	—
Seins	6	4	66 %	2	34 %
Thyroïde	1	1	100 %	0	—
Vessie	2	2	100 %	0	—
Rectum	15	15	100 %	0	—
Urines provenant d'individus sains	15	1	7 %	14	93 %
Urines provenant de tuberculeux	10	1	10 %	9	90 %
Urines provenant de femmes enceintes	10	3	30 %	7	70 %

Dans les chapitres suivants nous allons tenter d'augmenter la spécificité et la précision de notre méthode. A cet effet, nous allons introduire dans le système réactionnel du *sérum humain normal et cancéreux* pour observer son influence éventuelle sur l'extrait lytique des urines.

CHAPITRE VII

INFLUENCE DU SÉRUM SUR LA FIBRINOLYSE

Étude au moyen du Thrombographe de Hirtz.

Au cours de ces recherches, nous avons étudié les influences du sérum normal et du sérum de cancéreux, d'une part sur la *Fibrinolysine-standard*, et, d'autre part, sur l'*extrait fibrinolytique des urines de cancéreux*.

Détermination de l'Antifibrinolysine:

Le premier problème à résoudre est le dosage de l'*Antifibrinolysine naturelle* du sérum humain. La mise en évidence d'un antiferment et son étude quantitative sont dues surtout à VON KAULLA, qui a prouvé l'action frénatrice du sérum humain sur le phénomène de lyse; cette action est proportionnelle à la durée de contact *entre ferment et antiferment*, et à la concentration en antiferment, c'est-à-dire en sérum humain, dans le cas qui nous intéresse ici.

Dans ses travaux sur l'*Antistreptokinase*, CHRISTENSEN a démontré la nécessité d'inactiver le sérum afin d'éliminer les inhibiteurs de lyse, et il a publié l'exemple suivant :

TABLEAU N° 10

Temps d'inactivation à 56° en minutes	Temps de lyse en minutes	
	Sérum 1	Sérum 2
0	100	90
10	40	35
20	30	30
30	25	30
45	30	80

Il est ainsi prouvé qu'un chauffage de 30 minutes à 56° détruit environ 90 % des inhibiteurs non spécifiques, tandis que le titre d'*Antistreptokinase* reste pratiquement inchangé.

L'auteur procède alors à une dilution du sérum, il ajoute une quantité fixe de *Streptokinase* et laisse en contact pendant 30 minutes. Le tube où il ne s'est pas produit de lyse représente le taux de neutralisation et la quantité d'*Antistreptokinase* équivaut au nombre d'unités de *Streptokinase* ajoutée.

Nous basant sur cette méthode et sur le principe de la neutralisation de la *Fibrinolysine* par l'*antiferment correspondant du sérum*, nous avons élaboré une technique nous permettant de faire appel au Thrombographe de Hirtz.

A l'inverse des méthodes précédentes employant des gammes de dilution du sérum, nous avons recours à des dilutions de Fibrinolysine-standard.

Nous procédons avec les mêmes réactifs et selon la même technique que pour l'appréciation du pouvoir lytique de l'extrait urinaire, mais en exposant au préalable le sérum à l'action de la *Fibrinolysine* pendant un certain temps. En nous référant aux travaux de von Kaulla et de Frey, nous avons fixé ce temps de contact à 30 minutes, à une température de 37°.

En effet, ces auteurs considèrent que la fixation des deux facteurs dans le substrat biologique se fait selon une réaction *stoechiométrique* chimique. Ils ont exposé des sérums pendant des temps variables à l'action de la Streptokinase et ont étudié les modifications survenues dans les temps de lyse : ceux-ci ne sont pas modifiés par une interaction de moins de 15 minutes : de 15 à 20 minutes la réaction antigène-anticorps est entamée et après 20 minutes de contact le maximum de l'*Antistreptokinase* est déjà neutralisé. Nous voyons ici une confirmation de nos réactions précédentes sur l'activité lytique des urines : et c'est à juste titre que nous n'avons tenu compte que des temps de lyse inférieurs à 20 minutes, ces réactions échappant encore à l'action frénatrice du sérum dans le système de coagulation.

Par contre, nous pourrions trouver dans ces données l'explication des réactions faussement négatives, celles-ci étant peut-être dues *à un excès d'antiferment*.

Si ces affirmations sont purement théoriques, elles pourraient cependant expliquer certains phénomènes d'interruption de la courbe de lyse que nous avons remarqués dans quelques cas, et en général au bout de 20 à 30 minutes : une neutralisation survenue à ce moment empêcherait la poursuite du phénomène lytique. Nous avons même obtenu certaines courbes, dont nous reproduisons ci-dessous l'une des plus caractéristiques, où le système réactionnel, après avoir amorcé une lyse, s'est recoagulé et ceci entre 20 et 30 minutes d'expérience, phénomène qui pourrait s'expliquer par une neutralisation résultant de cette interaction entre ferment et antiferment.

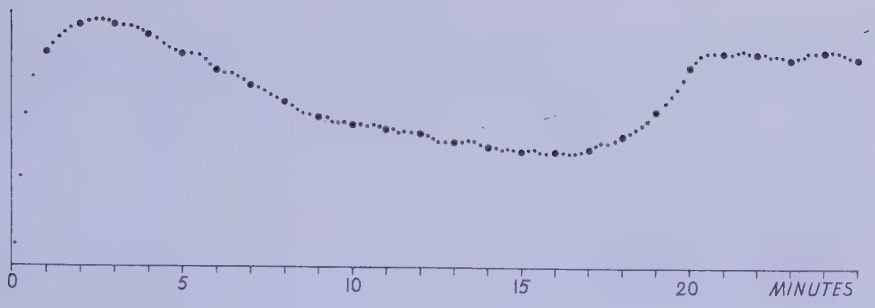


Fig. N° 11 — Phénomène de lyse suivi de recoagulation.

Protocole expérimental :

Nous avons procédé comme pour l'étude de la fibrinolyse, c'est-à-dire en nous référant à un système coagulant-étalon, dans lequel n'interviennent que des facteurs provenant de matériel non pathologique, notamment *le sérum humain normal inactivé et pur*, ainsi que des dilutions croissantes de *Fibrinolysine-standard*, que l'on met successivement en contact pendant 30 minutes dans la cuve du Thrombographe. Dans le tableau ci-dessous, nous reproduisons le protocole expérimental et les résultats de cette étude *du pouvoir antifibrinolytique du sérum humain normal sur une Fibrinolysine hétérogène :*

TABLEAU N° 11

Essai n°	Qualités de réactifs introduits :				Temps de lyse en minutes
	Sérum humain normal ml	0,1 ml de sol. de Fibrinolysine à :	Solution de Fibrinogène ml	Solution de Thrombine ml	
1	0,1	50 mg/ml	0,35	0,1	pas de coagulum
2	0,1	40 mg/ml	0,35	0,1	4′
3	0,1	20 mg/ml	0,35	0,1	5′30″
4	0,1	10 mg/ml	0,35	0,1	16′
5	0,1	5 mg/ml	0,35	0,1	sup. à 60′
6	0,1	2,5 mg/ml	0,35	0,1	sup. à 60′
7	0,1	1 mg/ml	0,35	0,1	sup. à 60′

Interprétation :

En considérant ce tableau, on voit que pour des concentrations en Fibrinolysine supérieures à 20 mg/ml, les temps de lyse ne sont guère

modifiés. On note un retard de 10 minutes par rapport au temps de lyse normal pour une concentration de Fibrinolysine de 10 mg/ml, et pour la dilution de 5 mg/ml, l'inhibition est complète : aucun phénomène de lyse ne se produit dans les 60 minutes de l'expérience. L'antiferment contenu dans 0,1 ml de ce sérum est par conséquent assez fort pour neutraliser une quantité de Fibrinolysine hétérogène comprise entre 5 mg/ml et 10 mg/ml.

Au lieu d'utiliser la *Fibrinolysine-standard*, nous pouvons procéder à des dilutions de *notre extrait urinaire* et apprécier de la même manière la concentration provoquant une inhibition de la lyse. Nous sommes ainsi en possession d'une méthode relativement simple de détermination du *pouvoir antifibrinolytique* d'un sérum inactivé, donc débarrassé de facteurs non spécifiques.

Étude comparative de l'Antifibrinolysine dans le sérum humain normal et cancéreux:

Pour réaliser cette expérience, nous procédons avec une concentration fixe de Fibrinolysine-standard de 10 mg/ml; notre système de coagulation artificiel est toujours identique.

Nous avons procédé à une première expérience en ayant recours *à un seul sérum cancéreux et à un seul sérum normal.* Nous avons d'abord contrôlé le système de coagulation seul, *sans Fibrinolysine*, puis éprouvé la *Fibrinolysine-étalon* pour tester la force lytique de la solution. A la concentration choisie de 10 mg/ml, le temps de lyse est pratiquement constant et de l'ordre de 10 à 11 minutes.

TABLEAU N° 11

Essai n°	Sérum humain		Solution Fibrinolysine 10 mg/ml ml	Durée du contact en minutes	Sol. Fibrinogène ml	Solution Thrombine ml	Temps de lyse
	normal ml	cancér. ml					
1	0,1	—	—	—	0,35	0,1	—
2	0,1	—	0,1	—	0,35	0,1	8′
3	0,1	—	0,1	30′	0,35	0,1	19′
4	—	0,1	0,1	—	0,35	0,1	9′
5	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	14′
6	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	15′30″
7	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	13′
8	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	13′30″
9	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	12′
10	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	16′
11	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	14′
12	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	13′30″
13	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	12′30″

Les deux sérums sont successivement mis en contact avec la *Fibrinolysine* dans le thermostat de l'appareil pendant 30 minutes, puis on ajoute le *Fibrinogène* et la *Thrombine*. On lit le temps de lyse :

— pour le sérum normal : 19'30", soit une inhibition de 9'30".

— pour le sérum de cancéreux, l'inhibition est de 4' seulement.

Nous reproduisons dans le tableau N° 11 les résultats d'une nouvelle série d'essais, effectuée au moyen de 10 sérums sains et 10 sérums de sujets cancéreux. Pour les sérums sains nous ne rapportons qu'un seul exemple, vu la constance des résultats de cette réaction.

Des essais effectués avec des sérums de 5 sujets tuberculeux ont donné les mêmes temps de lyse que ceux des sujets sains.

Interprétation :

En considérant ces résultats, nous pouvons en déduire que le sérum de sujets sains freine plus l'action lytique que le sérum de cancéreux. Pour expliquer ce phénomène, on pourrait admettre que le sérum de sujets sains contient *un taux d'Antifibrinolysine* supérieur à celui des sujets cancéreux. Chez ces derniers, ce déficit pourrait peut-être s'expliquer par une réaction antigène-anticorps, une partie de l'*Antifibrinolysine* étant absorbée par l'antigène spécifique. Lou et Windblad ont en effet constaté que l'*Antifibrinolysine* du sérum humain peut être considérée comme *un anticorps spécifique*, dont le taux peut augmenter progressivement au cours d'une infection streptococcique par exemple. Habituellement, cette augmentation évolue parallèlement avec celle de l'Antistreptolysine. Mais ce phénomène a également été observé chez des sujets exempts d'infection streptococcique.

Pour vérifier cette théorie antigénique, nous devions reprendre ces expériences en mettant en présence le sérum de cancéreux et son extrait urinaire homologue, pour contrôler si dans ces conditions nous obtenons une activité inhibitrice plus forte en employant un système antigène-anticorps homologue.

Pour réaliser cette expérience, nous avons recueilli les urines de deux jours d'un cancéreux, urines que nous avons conservées en présence de chloroforme, jouant à la fois *le rôle d'activateur et d'antiseptique*. Le précipité urinaire est préparé selon notre technique habituelle.

Le sérum homologue est décanté, centrifugé, inactivé et conservé à la glacière.

La force lytique de l'extrait urinaire est étudiée selon les techniques exposées dans la première partie de ces travaux et selon le schéma suivant : Sérum humain normal + extrait urinaire + système de coagulation ——→ temps de lyse = 15 minutes.

Si nous remplaçons *le sérum humain normal par le sérum de cancéreux*, le temps de lyse est de 17 minutes. Nous notons, par conséquent, déjà

une très légère inhibition du pouvoir lytique, peu significative cependant, la marge d'erreur étant de 1 à 2 minutes.

Dans un tube à hémolyse, nous mettons en présence à 37° au bain-marie : 0,5 ml de sérum + 0,5 ml de l'extrait provenant de 50 ml d'urine, et ceci pendant 30 minutes.

Dans ces conditions, la réaction de lyse est complètement inhibée et reste négative après 60 minutes pour le *sérum cancéreux* ; en présence d'un *sérum normal*, le temps de lyse est de 32 minutes. Dans le tableau suivant, nous rapportons le protocole expérimental et les résultats de ces essais :

TABLEAU N° 12

Essai n°	Sérum		Extrait urinaire cancér. ml	Temps de contact en minutes	Sol. Fibrinogène ml	Sol. de Thrombine ml	Temps de lyse en minutes
	normal ml	cancéreux ml					
1	0,1	—	—	—	0,35	0,1	—
2	0,1	—	0,1	—	0,35	0,1	15′
3	0,1	—	0,1	30′	0,35	0,1	32′
4	—	0,1	0,1	—	0,35	0,1	17′
5	—	0,1	0,1	30′	0,35	0,1	>60′

Après cet essai préliminaire, nous avons refait cette expérience au moyen de 5 *sérums de cancéreux en présence de leur extrait urinaire* homologue, en contrôlant d'une part la réaction de lyse immédiatement et, d'autre part après un contact de 30 minutes. Dans ce dernier cas, nous avons toujours constaté un temps de lyse plus lent que pour les sérums normaux, comme cela ressort du tableau suivant :

TABLEAU N° 13

Essai n°	Sérum		Extr. urinaire		Durée de contact en minutes	Temps de lyse en minutes
	n°	ml	n°	ml		
1	I	0,1	I	0,1	—	16′
2	I	0,1	I	0,1	30′	46′
3	II	0,1	II	0,1	—	20′
4	II	0,1	II	0,1	30′	sup. à 60′
5	III	0,1	III	0,1	—	17′
6	III	0,1	III	0,1	30′	50′
7	IV	0,1	IV	0,1	—	13′
8	IV	0,1	IV	0,1	30′	55′
9	V	0,1	V	0,1	—	18′
10	V	0,1	V	0,1	30′	sup. à 60′

Notre méthode au moyen du Thrombographe étant limitée dans le temps, nous avons jugé intéressant de reprendre ces mêmes essais au moyen de *la technique de* SALADIN en tubes à hémolyse. A cet effet, on introduit dans chaque tube à hémolyse stérile 0,5 ml de solution de Fibrinogène et 0,2 ml de solution de Thrombokinase.

Dans ses travaux, SALADIN utilisait 0,5 ml de l'*extrait urinaire* qui avait été dissous après extraction alcoolo-acétonique dans 7 ml de soluté physiologique. *La réaction Antifibrinolysine-Fibrinolysine*, c'est-à-dire l'interaction entre l'extrait urinaire et le sérum homologue se faisait pendant 6 heures à 37°, et non pas en 30 minutes comme c'est le cas dans notre méthode.

La seule modification que nous avons apportée à *la technique de* SALADIN se trouve dans la concentration de l'*extrait urinaire*, que nous avons repris dans seulement 2 ml de soluté physiologique pour obtenir une plus forte concentration et, par conséquent, pour réduire le temps de la réaction.

Chaque série comprend 10 tubes d'expérience et 3 tubes témoins : deux pour vérifier les propriétés lytiques de l'extrait urinaire, et le troisième pour contrôler la stabilité du coagulum.

On introduit donc 0,5 ml de l'extrait fibrinolytique + 0,2 ml de sérum homologue; on laisse 6 heures en contact à 37°, puis on ajoute le substrat réactionnel. On constate en effet qu'après ces 6 heures, il se produit à nouveau des phénomènes de lyse.

SALADIN indique que sa méthode, après contact préalable du sérum et de l'extrait urinaire correspondant, donne 91,7 % *de résultats positifs*. Mais nous avions entrepris ces essais dans le but de voir si la réaction d'inhibition constatée au *Thrombographe* était définitive et irréversible. Or, nos expériences précédentes nous permettent de supposer que l'*inhibition de l'action lytique ne serait qu'une phase de la réaction globale :* la phase d'absorption ou d'inactivation de la Fibrinolysine. Dans une deuxième phase interviennent probablement d'autres facteurs lytiques, qui ne se manifesteraient qu'au bout d'un certain temps de latence. Il pourrait s'agir de Trypsine ou d'autres enzymes protéolytiques. Au cours de la première phase, nous serions en présence d'une réaction antigène-anticorps comme elle se passe dans l'organisme, l'augmentation de Fibrinolysine entraînant une augmentation parallèle de l'Antifibrinolysine, *ce qui expliquerait le fort pouvoir inhibiteur spécifique du sérum de cancéreux*. L'excès de Fibrinolysine non activé « *in vivo* » serait rejeté au niveau du rein; selon SALADIN, il y aurait même à ce niveau *rupture du complexe Fibrinolysine-Antifibrinolysine* à poids moléculaire trop élevé, retour dans la circulation de l'*Antifibrinolysine* et élimination rénale de la *Fibrinolysine*.

SALADIN a également contrôlé 10 *sérums non cancéreux et quelques sérums d'individus sains ;* tous ces essais sont restés négatifs dans ses nouvelles conditions expérimentales, après interaction du sérum et de l'extrait urinaire.

On voit ainsi que le contact préalable du sérum et de son extrait urinaire homologue à 37° contribue à l'amélioration des résultats; les mélanges d'*extrait urinaire d'un même type de cancer*, mis en réaction avec *le sérum homologue*, augmenteraient la spécificité de la réaction.

Ces constatations nous permettent de conclure que nous nous trouvons en présence d'une *réaction antigène-anticorps*, dont nos expériences sont les manifestations « *in vitro* ». Cependant, le nombre relativement faible des essais qu'il nous a été possible de faire ne permet pas de tirer des conclusions définitives en ce qui concerne la généralisation de la réaction.

CHAPITRE VIII

MISE EN ÉVIDENCE DE LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS PAR DES ESSAIS BIOLOGIQUES

La dernière partie de nos travaux a porté sur la mise en évidence des *propriétés antigéniques de l'extrait urinaire*. A ce sujet, nous avons jugé intéressant d'utiliser d'une part une méthode relativement simple, *la réaction de précipitation en milieu gélatineux*, et d'autre part la technique classique d'inoculation au lapin.

Méthode biologique utilisant le lapin comme animal d'expérience :

Alors que *les propriétés antigéniques de la Streptokinase* sont connues et confirmées par les travaux de divers auteurs, nous n'avons trouvé aucune mention dans la littérature spécialisée, *de la Fibrinolysine en tant qu'antigène spécifique*. Par contre, de nombreux travaux ont mis en évidence *la forte action antifibrinolytique du sérum de lapin*.

Nos premiers essais de lyse en présence de sérum de lapin normal, remplaçant le sérum humain, et après un contact de 30 minutes avec la *Fibrinolysine-standard*, se sont avérés négatifs.

Selon FREY, il faudrait admettre que *le sérum de lapin ne contient pas de proactivateur de la fibrinolyse ;* d'après ses observations, le profacteur responsable de cette lyse se trouverait dans le sang total de lapin : en effet, des recherches avec du plasma de lapin recalcifié ont donné des résultats positifs. FREY suppose ainsi que le *profacteur* se trouverait dans le sang total et dans le plasma de lapin, mais ferait défaut dans le sérum, qu'il soit précipité au cours de la coagulation ou retenu dans le coagulum.

Il ressort de ces essais que *le sang de lapin ou son plasma* contient une dose beaucoup moindre de pro-activateur du Plasminogène que le sang humain. Ce faible taux est cependant suffisant pour produire dans le *système de coagulation naturelle* une fibrinolyse indubitable après addition d'un facteur activateur, *tel que la Streptokinase*.

Le *sérum de lapin* obtenu après coagulation définitive ne contient plus suffisamment de ce *pro-activateur* pour occasionner la fibrinolyse dans notre système de *coagulation standard, même après addition de Streptokinase*.

Il ressort de ces données que la technique que nous voulions utiliser pour le *dosage de l'Antifibrinolysine* ou des facteurs inhibiteurs en général

du processus fibrinolytique, ne devient valable pour le *sérum de lapin* que si l'on y ajoute le pro-activateur manquant. Pour cette raison nous avons eu recours au *Fibrinogène humain comme réactif dans notre système de coagulation standard*, puisque celui-ci contient, comme FREY a pu le démontrer, un taux élevé de pro-activateur actif. De cette façon il nous a été possible de mettre en évidence, *chez nos lapins immunisés au moyen des extraits urinaires fibrinolytiques*, la genèse des facteurs inhibant leur pouvoir lytique, et en particulier l'*Antifibrinolysine spécifique*.

Pour nos essais au moyen du *Thrombographe*, nous avons par conséquent remplacé le sérum humain par du *sérum de lapin inactivé*, qui doit contenir un taux insignifiant d'inhibiteurs spécifiques. Sa force inhibitrice naturelle serait uniquement constituée par le *déficit sérique du profacteur*.

Le *Fibrinogène de bœuf pur* est cependant remplacé par un mélange à parties égales de *Fibrinogène humain et bovin*, en solution à 0,6 %. Le Fibrinogène humain peut aussi être remplacé par le *sérum humain*. Dans ce cas, nous employons 0,05 ml de sérum de lapin et 0,05 ml de sérum humain.

Le dosage se déroule ensuite de la même façon que dans les essais précédents. En mettant en jeu un *sérum de lapin normal* après un contact de 30 minutes avec une solution de Fibrinolysine à 0,01 mg/ml, nous avons obtenu la courbe suivante :

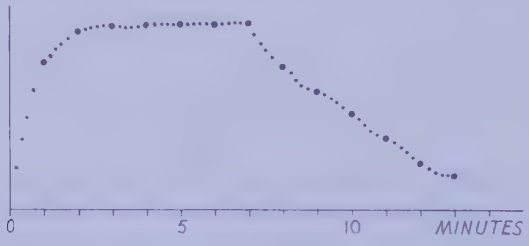


Fig. N° 12 — Courbe de lyse avec utilisation du sérum lapin

En considérant cette courbe, on voit que grâce à l'addition du profacteur, la réaction de lyse s'effectue normalement, abstraction faite d'un temps de latence.

Il nous suffit à présent de procéder à l'immunisation des animaux, puis de mettre en réaction l'*immunsérum* ainsi obtenu pour constater la présence ou l'absence d'inhibition par rapport à l'action de l'extrait lytique ayant servi à l'injection.

Essais d'immunisation des lapins par des extraits d'urines de cancéreux :

A cet effet, nous avons eu recours aux extraits urinaires provenant de quatre malades atteints de cancers différents. Nous désignons par la

suite ces extraits par les initiales du malade, suivies de l'initiale de la localisation du cancer :

SE-R (Rectum)
RI-S (Seins)
OE-P (Prostate)
GE-L (Langue)

Nous avons recueilli 2 litres d'urine de chaque malade. Après activation par la *Streptokinase*, nous avons procédé à l'extraction alcoolo-acétonique habituelle. Après dessiccation dans le vide sous Anhydride phosphorique, l'extrait est divisé en fractions réparties en ampoules scellées et conservées au réfrigérateur.

Comme antiseptique nous avons eu recours au *Nipasol*, ajouté au taux de 0,1% à la solution lytique. Pour la mise en suspension de l'extrait, nous nous sommes servis de soluté physiologique stérile.

Nous conservons toujours des concentrations telles que 1 ml de solution lytique correspond à l'extrait de 50 ml d'urine fraîche.

Pour l'immunisation, nous avons procédé à une injection sous-cutanée tous les 4 jours, avec des doses progressivement croissantes, selon le tableau ci-dessous :

TABLEAU N° 14

Date des injections	Lapin SE-R	Lapin RI-S	Lapin OE-P	Lapin GE-L
16-1	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
20-1	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
24-1	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
29-1	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
2-2	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
13-2	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml

Nous avons employé quatre jeunes lapins mâles, adultes et pesant environ 3 kg. Les animaux ont été préparés selon le tableau ci-dessus; l'injection de rappel a été faite 10 jours après la dernière injection.

Le sang est prélevé 45 jours après la première injection, par ponction de la veine marginale de l'oreille. On le recueille directement dans un tube à centrifuger; le sérum est décanté et inactivé pendant 30 minutes à 37°.

Mise en évidence des anticorps spécifiques :

Nous avons employé comme substrat spécifique *le sérum de lapin normal, du Fibrinogène humain et bovin ;* la *Fibrinolysine* employée comme

antigène pour ces expériences a été extraite du même échantillon d'urine que celui ayant servi à l'immunisation. A ce sujet, nous avons épuisé 50 ml d'urine, l'extrait purifié a été mis en solution dans 1 ml de soluté physiologique. Cet extrait étant stable, nous avons contrôlé son pouvoir lytique après avoir procédé aux essais préliminaires suivants :

Pour éprouver la *rigidité du coagulum*, nous avons mélangé :

Sérum de lapin normal inactivé	0,1 ml
Soluté physiologique	0,1 ml
Solution de Fibrinogène humain-bovin à 0,6%	0,35 ml
Solution de Thrombine	0,1 ml

Le mélange est éprouvé au Thrombographe : on obtient une coagulation normale, caractérisée par une courbe selon la figure N° 5.

Dans *un deuxième essai préliminaire*, nous avons remplacé *le sérum de lapin normal par du sérum de lapin immunisé ;* en l'absence d'un extrait lytique, la coagulation est également normale.

Dans un troisième essai, nous avons contrôlé la lyse du caillot en employant *le mélange d'antigène-anticorps* sans interaction préalable. A ce sujet on mélange :

Sérum de lapin immunisé	0,10 ml
Extrait lytique correspondant	0,10 ml
Solution de Fibrinogène humain-bovin à 0,6%	0,35 ml
Solution de Thrombine	0,10 ml

On place dans le Thrombographe et on constate que la lyse s'effectue en 20 minutes.

L'expérience proprement dite a été effectuée de la même façon, mais en laissant le *sérum de lapin immunisé* agir pendant 30 minutes sur son antigène, et ceci à 37°. Les autres conditions expérimentales sont toujours identiques. Nous notons alors une inhibition de lyse totale après 60 minutes.

Il en est ainsi pour les lapins SE-R, RI-S et OE-P, correspondant respectivement à un cancer du rectum, du sein et de la prostate. Pour le lapin GE-L, cancer de la langue, nous avons vu antérieurement que la réaction de neutralisation est douteuse au Thrombographe et se traduit par une courbe de lyse incomplète et irrégulière.

Afin de faciliter notre travail et de déterminer approximativement les doses d'anticorps et d'antigène se situant dans la zone de neutralisation optimale, nous avons procédé à une expérience supplémentaire par la méthode de Saladin en tubes à hémolyse. Cette réaction est effectuée au moyen de 7 tubes, comme nous l'avons exposé antérieurement.

Nous avons adapté les réactifs à cette méthode en tenant compte des observations de Saladin :

« *Si dans ces tubes témoins la lyse n'était pas amorcée après 3 heures, ou si le coagulum est dissout plus qu'à moitié après 5 heures, il faut modifier la concentration de l'extrait urinaire en conséquence* ».

Les résultats doivent être lus, d'après SALADIN, entre 5 heures et 25 heures. Cette analyse sérologique préliminaire nous a fixé sur les doses d'anticorps et d'antigène à utiliser pour la réaction de double diffusion en couche de gélose.

TABLEAU N° 15

Réactifs en ml	Tubes n°						
	1	2	3	4	5	6	7
Sérum de lapin immunisé..	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Sérum de lapin normal ...	—	—	—	—	0,2	—	—
Soluté physiologique	—	—	—	—	—	0,2	0,7
Extrait urinaire homologue	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Contact 6 heures à 37°							
Solution de Fibrinogène humain-bovin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution de Thrombine ..	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Résultat :

Dans les tubes N° 1, 2 et 3 correspondant aux extraits urinaires des *cancers du rectum, du sein et de la prostate*, aucun phénomène de lyse n'est apparu après 25 heures ; dans le tube N° 4 concernant le cancer de langue, la réaction de lyse est douteuse. Pour les témoins, elle apparaît après 45 minutes et est totale après 24 heures.

Interprétation :

Nous avons ainsi provoqué, par l'acte vaccinal, une apparition artificielle *d'Antifibrinolysines chez le lapin ;* ces anticorps amènent une inhibition totale du processus de lyse, dont le caractère de spécificité semble se confirmer par les réactions croisées que nous avons effectuées. En effet, nous avons remplacé les extraits urinaires par d'autres extraits, *provenant d'autres types de cancer :* L'inhibition obtenue par l'emploi de ces *antigènes hétérologues* était positive, mais moins prononcée que pour les *extraits homologues.*

D'après ces travaux, nous serions bien en présence d'une *réaction antigène-anticorps.* Nous n'avons malheureusement eu l'occasion d'opérer que sur 4 animaux, dont trois ont réagi spécifiquement de façon positive.

Étant donné le nombre restreint d'animaux employés, il nous semblerait prétentieux de vouloir formuler des conclusions valables ; cependant ces résultats semblent justifier une expérimentation sur une plus grande échelle, en procédant à des immunisations de lapins avec des types de cancer histologiquement déterminés.

Réaction de précipitation :

Nous avons pu mettre en évidence dans les expériences précédentes que la *Fibrinolysine* agit comme un antigène spécifique, provoquant l'apparition d'*Antifibrinolysines* dans le sérum des lapins. Nous avons par conséquent jugé intéressant de contrôler ce processus d'immunisation par la *technique de précipitation.*

A ce sujet, nous avons employé la méthode en boîtes de Pétri, découverte en 1946 par Oudin et mise définitivement au point en 1949 par Ouchterlony qui lui a donné le nom de « *technique de double diffusion* ». L'emploi de gel comme substrat pour les *réactions aux précipitines* a été introduit dès 1905 par Bechhold ; pour tous les détails, nous renvoyons à l'ouvrage de G. Ritschel-Beurlin (67).

On perce des trous d'un diamètre de 8 mm dans la plaque de gélose ; dans le trou central on introduit l'immunsérum et dans les autres, disposés en cercle à 10 mm du trou central, les antigènes à examiner. Une ligne de précipitation continue indique *l'identité de l'anticorps avec l'antigène employé.* En présence de plusieurs systèmes d'anticoprs-antigènes, on notera l'apparition d'autres lignes de précipitation qui s'entrecroisent.

Notre expérience a été réalisée avec de la gélose à 1,5 %, préparée selon les indications de Ritschel-Beurlin et diluée à l'aide d'un tampon Véronal sodique de pH = 8,2 et de force ionique 0,05.

Nous avons introduit dans le réservoir central l'*antigène urinaire* constitué par l'extrait de 50 ml d'urine repris pour ces réactions dans 0,5 ml de soluté physiologique, provenant du même échantillon que celui ayant servi à l'immunisation des animaux et conservé en ampoules scellées.

Après de nombreux essais préliminaires pour déceler la proportion optimale déterminant la réaction de précipitation entre antigène et anticorps, nous avons constaté qu'il fallait employer des dilutions différentes de nos immunsérums de lapin et une dose fixe des extraits urinaires antigéniques homologues.

C'est ainsi que des résultats positifs ont été obtenus en employant les gammes de dilutions suivantes :

pour l'immunsérum SE-R : de 1/4 à 1/64,
pour l'immunsérum RI-S : de 1/0 à 1/8,
pour l'immunsérum OE-P : de 1/16 à 1/250.

Pour l'immunsérum GE-L, il ne nous a pas été possible d'obtenir de résultats positifs, même aux concentrations les plus fortes (de 1/0 à 1/8).

Il est bien entendu que nous avons inactivé au préalable tous les immunsérums mis en œuvre.

Chaque expérience comportait trois boîtes de Pétri munies chacune de six réservoirs périphériques, dont cinq contiennent les dilutions d'immunsérum et le sixième du sérum de lapin normal comme témoin.

Dans le tableau ci-dessous, nous donnons les dilutions des divers immunsérums employés :

TABLEAU N° 16

Immunsérum	Dilutions employées — Réservoirs n°				
	1	2	3	4	5
SE-R	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
RI-S	1/0	1/1	1/2	1/4	1/8
OR-P.....	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

Nous illustrons les résultats de précipitations ainsi obtenus par 4 schémas, montrant les boîtes de Pétri contenant les immunsérums-antigènes mis à l'épreuve :

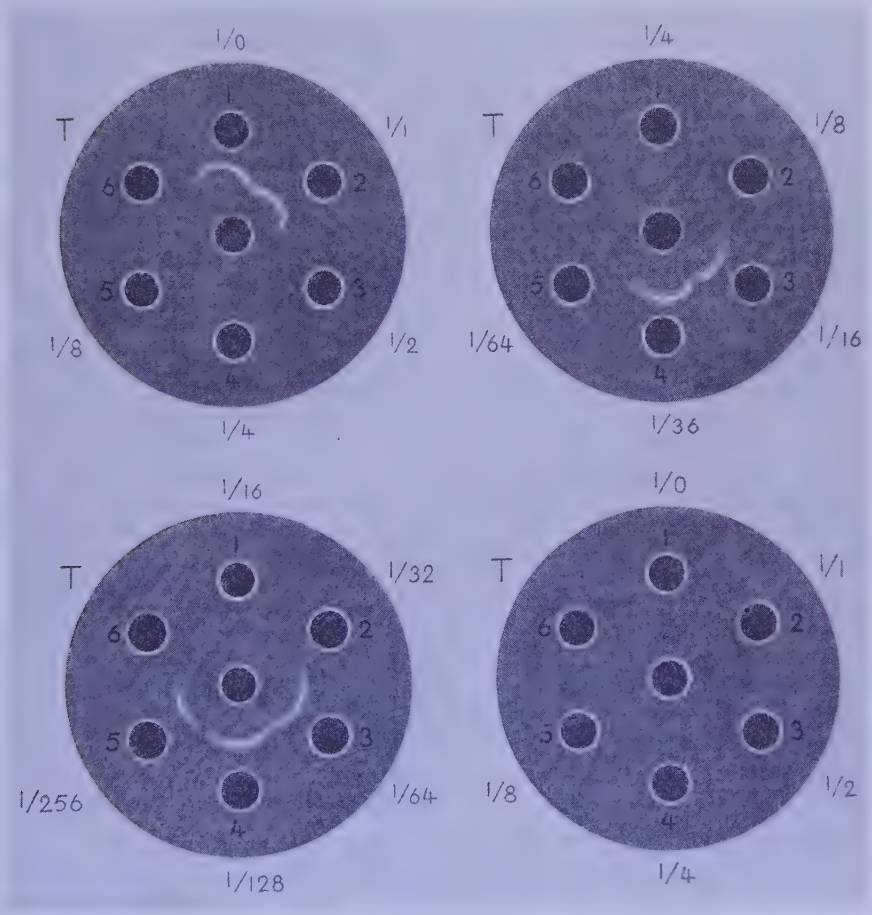


Fig. N° 13

Interprétation :

En considérant les figures ci-dessus, on constate que l'immunsérum SE-R donne, par rapport à son antigène homologue, des lignes de précipitation à des dilutions de 1/16 et 1/32 ; l'immunsérum RI-S n'agit que pur ou dilué à 1/1 ; l'immunsérum OE-P donne une réaction positive aux dilutions de 1/64, 1/128 et, plus faiblement, à 1/256.

On voit ainsi que l'immunsérum obtenu par l'antigène du *cancer de la prostate* doit contenir un taux maximum de précipitines, suivi de celui obtenu par l'antigène du *cancer du rectum*, alors que la Fibrinolysine urinaire provenant d'un *cas de cancer du sein* donne la réaction la plus faiblement positive. Ces résultats étaient constants pour les trois essais de chaque série.

Ils concordent sensiblement avec ceux obtenus lors des essais par la méthode en tubes selon SALADIN, et confirment la genèse *d'Antifibrinolysines par l'immunisation au moyen des extraits urinaires provenant, de cas de cancer de la prostate, du rectum et du sein*, et ceci à des taux décroissants selon cette énumération.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le but de notre travail était d'apporter une contribution à *l'étude du pouvoir fibrinolytique des urines de cancéreux*. A cet effet, nous avons mis au point une technique rapide et rationnelle pour contrôler ce processus lytique, en utilisant le Thrombographe de Hirtz.

La plupart des méthodes de dosage antérieures reposaient sur l'étude des produits de dégradation du Fibrinogène, soit par des réactions colorées, soit par la mesure des densités optiques des produits de dégradation acido-solubles, méthodes qui nécessitent souvent jusqu'à 25 heures d'observation et sont tributaires de facteurs individuels inhérents au manipulateur.

Notre technique, par contre, a l'avantage d'être d'exécution rapide et de donner des résultats comparables d'un essai à l'autre car le phénomène de lyse est enregistré mécaniquement. Nous y avons introduit un *système de coagulation artificiel*, de sorte que le Thrombographe n'enregistre que les phénomènes thrombélastiques dus au pouvoir fibrinolytique. L'introduction de la Thrombine dans ce système standard provoque la coagulation immédiate et de façon constante.

Nos premiers essais ont été effectués avec une *Fibrinolysine nettement définie*, qui nous a servi de témoin pour déterminer par comparaison les taux de *Fibrinolysine* contenus dans les urines de cancéreux. Nos recherches avaient trait à *l'extraction de cet enzyme et à l'étude de son pouvoir lytique et antigénique* dans le cadre de l'élaboration d'une méthode de diagnostic précoce du cancer. Malheureusement, il ne nous a pas été donné d'aboutir à ce résultat, car nous n'avons eu l'occasion de travailler qu'avec des urines de cas de cancer déclarés et cliniquement reconnus.

Nos expériences ont porté sur 84 urines de cancéreux et ont donné des résultats 100% positifs pour les cancers de la *prostate*, des *ovaires*, des *testicules*, de la *thyroïde*, de la *vessie* et du *rectum*. En ce qui concerne les tumeurs des poumons, du col, du vagin, du sein et de la langue, les résultats étaient moins probants. Les urines de *sujets sains*, *de tuberculeux et de femmes enceintes* étudiées comme témoins, ont donné pour les deux premiers des résultats négatifs dans environ 90% des cas et pour les femmes enceintes, dans 70% des cas.

De ces premiers essais, on peut déduire que cette technique présente un réel intérêt pour le diagnostic des cancers. L'avantage de notre méthode réside dans l'association des trois systèmes différents dans une même réaction :

Le *premier système* est un *gel de Fibrine artificiel*, préparé au moyen de Fibrinogène de bœuf hautement purifié et de Thrombine.

Le *second* est constitué par le sérum inactivé de sujets sains et cancéreux, apportant les ions Calcium et surtout un pro-activateur sérique nécessaire au processus fibrinolytique, L'inactivation préalable avait pout but d'inhiber certains facteurs frénateurs non spécifiques.

Le *troisième système* comporte les facteurs fibrinolytiques isolés d'urines de cancéreux activés par la Streptokinase.

Grâce à l'association de ces divers réactifs et à notre technique de préparation de l'extrait urinaire, nous avons pu adapter notre méthode à l'emploi du Thrombographe de Hirtz.

Dans une deuxième série de travaux, nous avons étudié *l'influence du sérum humain normal et cancéreux* sur le système de coagulation après un contact prolongé avec le facteur fibrinolytique. L'étude comparée de l'effet lytique avec ou sans interaction préalable à permis de mettre en évidence *certains facteurs antifibrinolytiques* présents dans les urines normales et cancéreuses. Ce pouvoir d'inhibition est plus prononcé pour *le sérum humain normal que pour le sérum humain cancéreux* dès que l'on n'emploie pas l'extrait urinaire homologue. Dans ce dernier cas, au contraire, nous assistons à une phase de neutralisation spécifique du pouvoir lytique. L'un des aspect du problème qui nous était posé était l'étude de ce processus de neutralisation; en effet, on peut se demander s'il s'agit d'une réaction antigéne-anticorps proprement dite. La plupart des méthodes antérieures employant des gammes de dilutions de sérum et de l'extrait urinaire, ne permettent pas d'appréciation nette du stade de lyse. En utilisant le Thrombographe de Hirtz, nous avons constaté que l'*Antifibrinolysine du sérum* peut être contrôlée par rapport à des quantités connues de *Fibrinolysine*. Le principe repose sur la détermination de la *dose maximale de Fibrinolysine* n'occasionnant pas de lyse dans notre système de coagulation standard.

La grande spécificité du *sérum cancéreux pour l'extrait urinaire homologue* plaide en faveur d'une réaction du type antigène-anticorps. Il faudrait donc admettre l'existence d'un anticorps dans le sérum, qui en se liant avec l'apoferment de la Fibrinolysine, serait responsable de l'inactivation partielle de celle-ci. L'antigène fibrinolytique serait éliminé par les urines, ce qui expliquerait la spécificité de l'extrait urinaire vis-à-vis du sérum cancéreux homologue. En effet, nous avons obtenu 92 % de résultats positifs en mettant au préalable en contact pendant 30 minutes à 37° l'extrait urinaire et son sérum correspondant.

Pour étudier les *propriétés antigéniques* de nos extraits urinaires, nous avons procédé à des expériences d'immunisation sur des lapins. La difficulté majeure résidait dans les *propriétés antifibrinolytiques* prononcées du sérum de ces animaux. Nous avons résolu ce problème en introduisant dans notre système de coagulation artificiel, à la place du *Fibrino-*

géne de bœuf pur, un mélange à parties égales de *Fibrinogène humain et bovin*, en solution à 0,6%. En effet, on sait que le Fibrinogène humain contient une dose suffisante de *Fibrinolysokinase*, manquante dans le sérum de lapin. C'est donc l'absence de ce pro-activateur dans ce sérum qui occasionne l'annulation du processus lytique. Nos extraits urinaires ont été activés au moyen de Streptokinase. Ces extraits ont été utilisés pour l'immunisation.

Nous avons ainsi pu obtenir *trois sérums de lapin riches en anticorps antifibrinolytiques*, que nous avons mis en évidence aussi bien par la *méthode thrombographique* que par la *réaction de précipitation en gel*. Ces réactions sérologiques ont été effectuées à l'aide de l'antigène homologue ayant servi à l'immunisation.

L'activation de la *Profibrinolysine par la Fibrinolysokinase* nous semble correspondre à un processus enzymatique; par contre, l'*Antifibrinolysine* agit comme un antagoniste du processus lytique, d'après *les principes d'une réaction antigène-anticorps*.

La Fibrinolysine isolée des *urines de cancéreux* s'est avérée plus active dans 80% des cas, que celle des sujets sains ou atteints d'autres maladies.

Nous sommes conscient que la quantité restreinte du matériel pathologique étudié et le nombre réduit d'animaux utilisés ne donnent pas un poids suffisant à nos recherches pour justifier l'emploi de notre technique dans le diagnostic précoce du cancer ou pour le contrôle de l'évolution d'un cancer cliniquement établi. Par contre, elle peut servir de point de départ à de nouveaux travaux sur une plus grande échelle pour étudier les problèmes du rapport entre le pouvoir fibrinolytique et la genèse *des Antifibrinolysines en général et chez les cancéreux en particulier*. Nos travaux constitueraient ainsi un chaînon dans la mise au point d'une méthode de diagnostic précoce du cancer.

BIBLIOGRAPHIE

(60) Albers, Merken et Mucke. — Zeitschr. f. Krebsforsch., 1938, 47, 512.

(38) Alkjaersig. — Voir : Kline : Journ. Biol. Chem., 1953, 204, 949.

(43) Andrus W., Lord J., Kaner A. — Science, 1940, 91, 48.

(5) Aron M. — C. R. Acad. Sciences, 1936. 203, 1550. Entretiens de Bichat, Médecine, 1956, 473.

(64) Aron M. — Entretiens de Bichat, Médecine, 1956, 473.

(34) Astrup T. — Acta Haematol., 1952, 7, 271.

(35) Astrup T. — Acta Physic. Scandin., 1944, 7, suppl. 21.

(11) Astrup et Permin. — Nature, 1947, 159, 681.

(58) Beckmann R. — Deutsch. Med. Woch., 1959, 12, 566.

(19) Berg St. — Deutsch. Zeit. ges. Med., 1950, 28, 507.

(27) Berg St. — Deutsch. Zeit., ges. Med., 1950, 40, 1.

(24) Berg et Fantl. — Arist. Journ. exp. Biol. Med. Science, 1948, 26, 521.

(30) Bjerrehuus. — Scand. Journ. Clin. Lab. Invest., 1952, 4, 178.

(50) Christensen. — Journ. of gen. phys., 1948, 28, 363 et 559.

(8) Christensen et Mac Leod. — Journ. Gen. Phys., 1945, 28, 559.

(44) Cliffton. — Cancer, 1950, 83, 486. Journ. Labor. Clin. Med., 1952, 39, 105.

(31) Colgan, Gates et Miller. — Journ. exp. Med., 1952, 95, 531.

(63) Colgan et coll. — Journ. exp. Med., 1952, 95, 531.

(32) Damgaard et Ungar. — Amer. Journ. physiol., 1952, 171, 717.

(14) Dastre. — Arch. Physiol. norm. et apthol., 1893, 5, 661.

(39) Delezenne et Loomis. — Journ. Biol. Chem., 1905, 233, 81.

(18) Delezenne et Pozerski. — C. R. Soc. Biol., 1903, 55, 327.

(23) Deutsch E. — Blutgerinnungsfaktoren, Deuticke, Wien, 1955, 179.

(59) Dumm et Greenhouse. — Publ. Health Service Public, 1950, 9.

(41) Eichenberger E. et Schœnholzer G. — Verb, Deutsch. Gesell. Inneren Med., 62e congrès, Munich, 1956, p. 200.

(56) Elsner. — Fibrinolyse in Schwangerschaft und Geburt, 1957, 6, 31.

(9) Ferguson. — Science, 1947, 105, 488.

(12) Ferguson, Pravis et Gerheim. — Blood, 1948, 3, 1 130.

(66) Frey W. — Streptokinase et Antistreptokinase. Étude expérimentale et immunologique. Thèse Docteur Pharmacie, Strasbourg, 1959.

(57) Fuchs H. J. — Biochem. Zeitschr., 1926, 170, 76; 1926, 176, 185.

(28) Gluck et Mirsky. — Amer. Journ. Obstetr. Gynec., 1941, 42, 267.

(1) Greenstein J. P. — Biochem. of Cancer, II édit., N.Y., 1954.

(6) Grego S. — Méthodes de diagnostic des cancers basées sur les réactions sérologiques. Thèse Doct. Pharmacie, Strasbourg, 1957.

(26) Halse Th. — Arch. Intern. Pharmacodyn., 1949, 80, 444.

(15) Judin. — Presse Médicale, 1936, 44, 63.

(2) Karlson P. — Erg. Enzyme Forsch., 1954, 13, 85.

(22) Kaulla (von) K. N. — Schweiz. Med. Woch., 1947, 77, 313.

(54) Kaulla (von) K. N. — Nature, 1949, 164, 408.

(29) Kaulla (von) et Shettles. — Proc. exp. Biol. Med., 1953, 83, 692.

(21) Kerrinnes-Jauernis et Knobloch. — Zeit. Altersforsch., 1953, 7, 25.

(3) Lang K. — Biol. der Enzyme, 4. koll. Berlin, Heidelberg, 1953, p. 1.

(65) Lang-Phillips L. — Cancer, 1959, 12, 4.

(10) Loomis, George et Ryder. — Arch. Biochem., 1947, 12, 1.

(46) Mac Farlane et Pilling. — Nature, 1947, 159, 779.

(55) Milstone. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1949, 72, 315.

(20) Mullertz. — Acta phys. Scand., 1952, 27, 264.

(61) Mullertz — Biochem, Journ., 1955, 61, 424.

(4) Nitsche. — Blood, 1947, 2, 363.

(33) Nitsche. — Blood, 1947, 2, 363.

(16) Nolf P. — Arch. Intern. Physiol., 1908, 6, 115.

(49) Norman P. S. — Journ. exp. Méd., 1943, 108, 13.

(17) Opie et Barker. — Journ. exp. Med., 1907, 9, 207.

(67) Ritschel-Beurlin. G. — Les anticorps précipitants dans la poliomyélite — Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1960.

(53) Rocha, Silva, et Rimington. — Biochem. Journal., 1948, 42, 163.

(7) Saladin R. — Essais sur le sérodiagnostic du Cancer. Thèse Docteur Pharmacie, Strasbourg, 1960.

(45) Singher H. O., Shapple R. W. — Clin. Med., 1959, vol. 6, 108.

(25) Soulier J. P. — Revue d'Hématol., 1948, 3, 302.

(62) Soulier et Koupernik. — Sang., 1948, 19, 362.

(13) Tagnon H. — Journ. Labor. and. Clin. Med., 1942, 9, 1 119.

(51) Tillett W. S. — Proc. Soc. exp. biol. Med., 1937, 37, 77.

(52) Tillett et Garner. — Journ. exp. Med., 1934, 60, 239 et 255.

(48) Ungar et Damgaard. — Journ. of. exp. Med., 1952, 93, 89.

(40) Unger et Shapiro. — Blood, 1948, 3, 137, Journ. Clin. Invest., 1948, 27, 39.

(37) Ware et Seegers. — Journ. Biol. Chem., 1948, 172, 699.

(42) Weiner M. Zeltmacher K., Reich C. et Shapiro S. — Blood, 1948, 3, 1275.

(47) Williams J. R. — Journ. exp. Path., 1951, 32, 530.

Vu, Strasbourg, le 24 Septembre 1964

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 25 Septembre 1964

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

G. GAZET DU CHATELIER.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 28 Septembre 1964

Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université,

J. F. ANGELLOZ.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 9

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Généralités sur la Fibrinolysine 11

CHAPITRE II

Les différentes théories sur la Fibrinolyse 15

Définition de la fibrinolyse 15
Théorie stœchéïométrique 16
Théorie catalytique 19
Théorie de l'activation autocatalytique 19
Données actuelles sur l'antifibrinolyse 21

CHAPITRE III

Préparation de la Fibrinolysine et de la Profibrinolysine 25

Préparation de la Fibrinolysine 25
Préparation de la Profibrinolysine 27
Dosage de l'activité protéolytique 28

CHAPITRE IV

Fibrinolysine et Cancer 29

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V

Etude du pouvoir lytique d'extraits urinaires par le Thrombographe de Hirtz 33
Principe 34
Composition du système de coagulation artificiel 34
Protocole expérimental 37
Étude du pouvoir lytique de doses décroissantes de Fibrinolysine 39

CHAPITRE VI

Étude du pouvoir lytique d'extraits urinaires d'origine cancéreuse par le Thrombographe de Hirtz 43
Isolement d'un enzyme fibrinolytique à partir d'urines de cancéreux 43
Essais d'activation de la Profibrinolysine 45
Contrôle du pouvoir fibrinolytique des urines saines 47
Étude quantitative du pouvoir lytique des urines de cancéreux 48
Étude qualitative et quantitative portant sur 84 échantillons d'urines cancéreuses 50
Conclusion 52

CHAPITRE VII

Étude de l'influence du sérum sur la Fibrinolyse par le Thrombographe de Hirtz 55
Détermination de l'Antifibrinolysine 55
Étude comparative de l'Antifibrinolysine dans le sérum humain normal et cancéreux 58

CHAPITRE VIII

Éssais biologiques de mise en évidence de la réaction antigène-anticorps 63
Méthode biologique utilisant le lapin comme animal d'expérience 63
Essais d'immunisation des lapins par des extraits d'urines de cancéreux 64
Mise en évidence des anticorps spécifiques 65
Réaction de précipitation 68

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 71

BIBLIOGRAPHIE 75

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg — Dépôt légal 4134/64.